

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**CISTATINA C EN PACIENTES CON
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.
RELACIÓN CON LA FUNCIÓN Y EL
DAÑO RENAL Y CON EL RIESGO
CARDIOVASCULAR**

PATRICIA GARCÍA GARCÍA

TESIS DOCTORAL

MADRID, 2015

PATRICIA GARCÍA GARCÍA

**CISTATINA C EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO. RELACIÓN CON LA FUNCIÓN Y EL DAÑO RENAL
Y CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR**

DIRECTORES:

Dr. MIGUEL YEBRA BANGO. PROFESOR HONORARIO
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE
MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE
HIERRO MAJADAHONDA.

Dr. PABLO TUTOR DE URETA. PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID Y MÉDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE MEDICINA
INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO
MAJADAHONDA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

2015

AGRADECIMIENTOS

Siempre he tenido claro lo importante que son las experiencias que una persona atesora en su vida, y para mí, realizar la Tesis era una de ellas. Mucha es la ilusión y el entusiasmo que se deposita al comienzo, mucho el trabajo en el desarrollo y muy duro el final. En esos momentos, alguien me dijo que hacia atrás solo se va para obtener el impulso necesario para dar un salto grande, y es que el no rendirse garantiza el éxito y finalmente, obtener la recompensa. En la realización de esta Tesis Doctoral han participado numerosas personas a las que quiero ofrecer mi más sincero agradecimiento, ya que no solo han impedido que vaya hacia atrás, sino que me han impulsado para dar este gran salto.

En primer lugar a mis directores de tesis. Al Dr. Miguel Yebra, por su ilusión y sus incansables ganas de trabajar; por enseñarme la importancia de la constancia y el rigor y por compartir conmigo esa fuente de sabiduría inagotable y ser un Maestro de la Medicina de los que pocos quedan. Gracias por toda la confianza y paciencia depositada en mí. Al Dr. Pablo Tutor, por su inestimable ayuda, su visión crítica, su ánimo y por haber sido mi guía docente en los años de residencia.

Quería hacer una mención muy especial a la Dra. Raquel Castejón, sin la cual, esta tesis no hubiera podido realizarse. Por sus consejos e ideas, por su buen humor y sobre todo, su optimismo. Por hacer sencillo lo imposible y ser una persona excepcional.

Al resto de componentes del Laboratorio de Enfermedades Autoinmunes, a María Jesús Citores y Silvia Rosado, por su ayuda técnica en el laboratorio.

A todos los componentes de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, al Dr. Juan Antonio Vargas y la Dra. Susana

Mellor. Gracias por vuestro apoyo y ganas de colaborar. Gracias por transmitirme esta curiosidad por las Enfermedades Autoinmunes.

Al Dr. Carlos Jiménez Ortiz, neurólogo del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, por enseñarme los fundamentos de la elasticidad arterial y realizar los estudios en los pacientes.

A la Dra. Ramona de los Ángeles Silvestre, médico bioquímico del Hospital Puerta de Hierro de Majadahonda, por su colaboración para el análisis de la cistatina C.

Agradezco así mismo a todos los miembros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, desde el Jefe de Servicio, el Dr. Valentín Cuervas-Mons, por su empeño en que todos tengamos nuestro título de Doctor, hasta todos los adjuntos que durante estos años me han enseñado los fundamentos de la Medicina Interna y el impecable trato al paciente.

Al resto de residentes, mayores y pequeños, por compartir conmigo todos esos momentos y formar parte de los mejores recuerdos de estos años.

A los miembros de la secretaría de Medicina Interna, por su colaboración a la hora de gestionar las citaciones de los pacientes, siempre con amabilidad y una excelente predisposición.

A Isabel Millán la ayuda prestada en la realización de los análisis estadísticos.

Por último, quisiera agradecer a mis padres el cariño, la educación y los valores que me inculcaron, así como la oportunidad que finalmente me pudieron brindar para estudiar Medicina. A mi padre, por confiar siempre en mí y mostrar una

paciencia infinita en cada minuto; por ser mi referencia personal. A mi hermana, por ayudarme y apoyarme incondicionalmente y ser mi protectora. A los dos, porque a pesar de las adversidades, somos una unidad. A ellos les dedico esta Tesis.

A mi padre,

A mi hermana,

A mi madre

ABREVIATURAS

ACR: American College of Rheumatology

ACV: accidente cerebrovascular

AHA: American Heart Association

ANCA: anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo

AR: artritis reumatoide

ARA II: antagonistas de los receptores de la angiotensina

ATP III: Adult Treatment Panel III

Beta2GP1: anticuerpos anti β 2 glicoproteína 1

CPE: células progenitoras endoteliales

CKD-EPI: chronic kidney disease-Epidemiology Collaboration

CSF: cerebro spinal fluid, líquido cefalorraquídeo

DAS 28: Disease Activity Score basado en 28 articulaciones

DE: desviación estándar

DL: dislipemia

DM: diabetes mellitus

DMF: dilatación mediada por flujo

DO: densidad óptica

ECV: enfermedad cardiovascular

EKG: electrocardiograma

ELISA: enzima inmunoensayo

ET-1: endotelina 1

GAA: glucemia alterada en ayunas

GIM: grosor íntima-media

FRCV: factores de riesgo cardiovascular clásicos

FG: filtrado glomerular

HDL: colesterol de alta densidad

HECV: historia familiar de enfermedad cardiovascular

HTA: hipertensión arterial

IAM: infarto agudo de miocardio

ICC: insuficiencia cardíaca congestiva

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IFN γ : interferón gamma

IL-2: interleucina-2

IL-6: interleucina-6

IMC: índice de masa corporal

ITB: índice tobillo-brazo

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

LES: lupus eritematoso sistémico

MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

MFM: micofenolato de mofetil

PAS: presión arterial sistólica

PCR: proteína C reactiva

RR: riesgo relativo

SLAM: Systemic Lupus Activity Measure

SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLICC/ACR: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American
College of Rheumatology Damage Index

SM: síndrome metabólico

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

TA: tensión arterial

TAS: tensión arterial sistólica

TAD: tensión arterial diastólica

TAC: tomografía computarizada

TFG: tasa de filtrado glomerular

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

VOP: velocidad onda de pulso

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	2
1.1. El riesgo cardiovascular en el LES	3
1.2. La arteriosclerosis subclínica en el LES	6
1.3. El papel de la enfermedad lúpica en la arteriosclerosis subclínica	10
1.4. Nuevos marcadores biológicos de arteriosclerosis subclínica	12
1.4.1. Factores solubles	12
1.4.2. Células progenitoras endoteliales	13
1.5. Relación entre la enfermedad renal, LES y riesgo cardiovascular	15
2. CISTATINA C	16
2.1. Determinación de la cistatina C	19
2.2. Relación de la cistatina C con el estado de inflamación	21
2.3. Cistatina C como marcador de función renal	22
2.4. Cistatina C como marcador de riesgo cardiovascular y arteriosclerosis	23
2.5. La relación de la cistatina C con el riesgo cardiovascular en pacientes con LES	26

OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. PACIENTES	31
2. PROTOCOLO Y DISEÑO	34
3. DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO	
CARDIOVASCULAR	35
4. DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES RELACIONADOS	
CON EL LES	37
5. DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS	43
6. MEDIDA DE LA FUNCIÓN Y DAÑO ESTRUCTURAL RENAL	43
7. DETERMINACIÓN DE LA CISTATINA C	45
8. PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN DE	
ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA	46
8.1. Cuantificación del grosor intima-media (GIM)	46
8.2. Medida de la elasticidad arterial mediante velocidad	
onda de pulso (VOP)	47
9. ESTUDIO Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS	
PROGENITORAS ENDOTELIALES Y FACTORES	

SOLUBLES EN SUERO	50
9.1. Obtención de muestras	50
9.2. Determinación de las células progenitoras endoteliales circulantes	51
9.3. Estudio de la expresión de factores solubles en el suero	53
10. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	55
 RESULTADOS	 56
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES	58
1.1. Descripción de los parámetros de función renal	58
1.2. Descripción de los factores de riesgo cardiovascular	59
1.3. Descripción de los factores inflamatorios	62
1.4. Descripción de los factores relacionados con el LES	63
2. DETERMINACIÓN DE CISTATINA C	66
3. CISTATINA C COMO MARCADOR DE FUNCIÓN RENAL EN PACIENTES CON LES	 67
4. CISTATINA C COMO MARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON LES	 70
4.1. Asociación de la cistatina C con factores de riesgo	

cardiovascular	70
4.2. Asociación de la cistatina C con tratamiento con	
diana cardiovascular	72
4.3. Asociación de la cistatina C con marcadores de	
inflamación	73
4.4. Asociación de la cistatina C con nuevos biomarcadores	
de riesgo cardiovascular: Células progenitoras endoteliales	75
4.5. Asociación de la cistatina C con factores relacionados	
con el LES	77
4.6. Asociación de la cistatina C con la arteriosclerosis	
subclínica determinada por la velocidad onda pulso	
y el grosor intima-media	80
4.7. Análisis de regresión logística	82
5. CISTATINA C COMO MARCADOR	
INDEPENDIENTE DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA	83
DISCUSIÓN	85
1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CISTATINA C	88
2. CISTATINA C COMO MARCADOR DE FUNCIÓN RENAL	

EN PACIENTES CON LES	89
3. CISTATINA C Y SU RELACIÓN CON MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	92
4. CISTATINA C Y SU RELACIÓN CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN	95
5. CISTATINA C Y NUEVOS BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES	98
6. CISTATINA C Y SU RELACIÓN CON MARCADORES DE LES	99
7. CISTATINA C Y ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA	101
8. CISTATINA C COMO MARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR INDEPENDIENTE EN PACIENTES CON LES	104
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN

1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, cuya base es la alteración de la respuesta inmunológica. La producción de autoanticuerpos contra los antígenos propios liberados por células con defectos en los mecanismos apoptóticos, produce unos inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, cuyo depósito desencadenaría una inflamación y daño que puede afectar a múltiples órganos y tejidos. La enfermedad tiene como diana principal la piel y articulaciones; también riñón, sistema nervioso y membranas serosas, pero cualquier órgano puede estar involucrado. La etiología es desconocida, pero factores genéticos, ambientales y hormonales juegan un papel, que aún a día de hoy, es difícil de precisar.

Los corticoides han modificado el curso rápidamente fatal de la enfermedad y los antimaláricos e inmunosupresores han prolongado la supervivencia. El descubrimiento de las células LE y los anticuerpos anti ADN permitieron un diagnóstico precoz y la disminución de los niveles de complemento, ayudó a la detección de las exacerbaciones.

En este marco, a partir de los años 70 se empezó a detectar que el aumento de la incidencia de la enfermedad cardiovascular y ya no tanto las complicaciones agudas, determinarían la supervivencia de estos pacientes.

1.1. El riesgo cardiovascular en el lupus eritematoso sistémico

Las **primeras referencias** en la literatura se remontan al año 1976, cuando el grupo de Toronto definió por primera vez que la mortalidad de los pacientes con LES respondía a un patrón bimodal (*Urowitz, 1976*). En dicho estudio de 81 pacientes, 11 fallecieron, 6 de ellos de manera precoz en el primer año de diagnóstico por enfermedad activa e infecciones. Los otros 5 pacientes fallecieron tardíamente; todos ellos presentaban un lupus inactivo y murieron por un infarto agudo de miocardio. Este hallazgo fue confirmado por el mismo grupo (*Rubin, 1985*) y por *Abu-Shakra, 1995*, concluyendo que la causa de muerte en los pacientes con LES de más de dos años de evolución fue por infarto agudo de miocardio (IAM) hasta en un 30%. Otros estudios más recientes como el de *Bernatsky, 2006*, con una cohorte internacional de 9547 pacientes con LES, objetivaron un descenso global de mortalidad relacionada con la actividad de la enfermedad en las últimas dos décadas, de hasta el 60%, mientras que no se modifica la mortalidad de causa cardiovascular.

Los **estudios necrópsicos** que se encuentran en la literatura, como el de *Bulkley, 1975*, concluyeron que hasta el 42% de los pacientes en tratamiento con corticoides durante más de un año, presentaban obstrucciones coronarias de origen arteriosclerótico. Este dato fue similar a lo encontrado en el estudio de *Rubin, 1985*. En el estudio de *Haider, 1981*, que cuantifica el grado de obstrucción coronaria en estudios necrópsicos de 22 pacientes con LES, objetivó que el número de segmentos enfermos de arterias coronarias de los pacientes con LES era mayor que en los controles y que aquellos con una obstrucción coronaria superior al 75%, tenían mayor número de factores de riesgo cardiovascular.

La **incidencia IAM** en los pacientes de LES es elevada. En la cohorte de Baltimore, la incidencia de angina o IAM fue del 8% (*Petri, 1992a*), similar a la observada por *Urowitz, 1976; Abu-Shakra, 1995* y *Manzi, 1997*. En series más actuales, se refirió que el 10.9 % de los pacientes desarrollaron un evento vascular agudo en su cohorte de 1142 pacientes, con seguimiento desde el diagnóstico de 8 años (*Urowitz, 2007a*).

Manzi, 1997, en su trabajo basado en la comparación de 498 mujeres con LES con 2000 mujeres de la cohorte Framingham, determinó que las mujeres con LES entre 35 y 44 años, tenían 50 veces más **frecuencia** de un IAM que las mujeres de la misma edad, sexo y semejantes factores de riesgo. Estos autores concluyeron que la enfermedad cardiovascular es globalmente siete veces más frecuente en pacientes con LES que en la población general. En un estudio más reciente de 2012, el equipo de *Magder y Petri*, cifran este ratio en 2.66, considerando globalmente todos los rangos de edad.

En 1999, *Ward* afirma que el IAM es la **causa de hospitalización** en el 0.52% de los LES entre 18-44 años, frente a un 0.23% en el grupo control. La insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) fue la causa de hospitalización más frecuente en todos los grupos de edad y los ingresos por accidente cerebrovascular (ACV) fueron dos veces más frecuente que en el grupo control.

En vista de lo descrito previamente, parece que la vulnerabilidad del sistema cardiovascular de los pacientes con LES es incuestionable y plantea la arteriosclerosis como posible responsable.

El aumento de la **prevalencia de factores de riesgo clásicos** en estos pacientes, comparado con controles sanos, se encuentra reflejado en múltiples estudios. Algunos

autores cifran la prevalencia de tener 3 o más factores de riesgo en el 53 % de sus 225 pacientes con LES (*Petri, 1992a*). Más de una década después, *Bruce, 2003*, observa una presencia significativamente mayor de hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM) y también para la media del número de factores de riesgo en los pacientes con LES.

Cuando se compara la prevalencia de los factores de riesgo en pacientes con LES y enfermedad coronaria, con los pacientes con LES pero sin evidencia de enfermedad coronaria, el grupo de *Manzi, 1999*, publica diferencias significativas en la presencia de hipercolesterolemia y el de *Petri* encuentra un aumento significativo de la hipertensión arterial, hipercolesterolemia y obesidad (*Petri, 1992b*).

Estos estudios sugerían que en los enfermos con LES, la presencia de enfermedad coronaria se debía a la existencia de más factores de riesgo clásicos que la población general. Actualmente se sabe que estos factores de riesgo por sí solos, no explican el incremento de la incidencia de eventos vasculares en estos pacientes. El grupo de *Esdaile* en el año 2001, concluyó que la presencia de LES, a igualdad de factores de riesgo vascular, aumentaba el riesgo de enfermedad coronaria (riesgo relativo (RR 7.5), de ACV (RR 7.9), de IAM no fatal (RR 10.1) y de muerte por enfermedad cardiovascular (RR 17), demostrando que los pacientes con LES necesitan menos factores de riesgo clásicos para desarrollar enfermedad isquémica coronaria, por lo que debe existir una actividad aterogénica de la propia enfermedad.

1.2. La arteriosclerosis subclínica en el lupus eritematoso sistémico

La elevada incidencia de arteriosclerosis como mecanismo causante de enfermedad coronaria en los pacientes con LES, y su implicación pronóstica, lleva al interés en la investigación de diferentes técnicas para la identificación de la arteriosclerosis subclínica, preferiblemente no invasivas y de fácil aplicación.

La arteriosclerosis es una alteración anatómica de la pared vascular, que puede detectarse por diferentes técnicas, no todas igual de sensibles y reproducibles. El espectro va desde la medida de la disfunción endotelial y de la velocidad de onda de pulso, al índice tobillo-brazo, pasando por el grosor íntima-media arterial y la presencia de placa carotídea o depósito de calcio en las arterias, a través de ecografía y TAC coronario respectivamente.

Dentro de los estudios que valoran la existencia de **placa carotídea** en pacientes con LES, destaca el de *Roman, 2003*, que concluye que los pacientes con LES, presentan una mayor prevalencia de placa carotídea en todos los grupos de edad, similar a lo observado en otras series (*Selzer, 2001; Reynolds, 2010*). Este mismo grupo, valoró la existencia de nuevas placas carotídeas o la progresión de las mismas en un seguimiento ecográfico de tres años. Los resultados mostraron un crecimiento de un 10% al año, mayor que el 5% evidenciado en los controles (*Roman, 2007*).

En cuanto al **depósito de calcio en las arterias coronarias**, *Asanuma, 2003*, recurre al TAC coronario observando que en su cohorte de 65 pacientes con LES, es más frecuente la presencia de calcificación coronaria que en 69 controles sanos. Además, no objetivan diferencias en el número de factores de riesgo cardiovascular tradicionales, sugiriendo nuevamente el papel patogénico de lupus eritematoso

sistémico en sí mismo. Otros autores como *Yiu, 2009*, investigan los depósitos de calcio en diferentes arterias (carótidas, coronarias y aorta) en pacientes con LES comparado con controles, aportando que los pacientes con LES presentaron una mayor prevalencia y extensión de calcificación arterial en todos los lechos vasculares, sobre todo a nivel coronario.

La determinación del **grosor íntima-media** (GIM) en la arteria carótida común mediante ecografía doppler, es otra de las técnicas aceptada como marcador de arterioesclerosis subclínica (*Poredos, 2004*) y parece estar asociada a incremento de riesgo de IAM e ictus en población general, como objetivó el grupo de *O'Leary, 1999*. Sin embargo, los trabajos publicados en LES muestran resultados contradictorios, aunque la mayoría obtienen mayores niveles de GIM en pacientes con LES que en controles (*Colombo, 2007; Shang, 2008; Cacciapaglia, 2009; De Leeuw, 2009*).

La determinación del **índice tobillo-brazo** (ITB) se calcula mediante la relación entre la presión arterial sistólica (PAS) medida en el tobillo y la PAS medida en el brazo. En un individuo sano esta relación es ≥ 1 . Esta medida se ha sugerido como predictor de arteriosclerosis coronaria y eventos cardiovasculares en población general (*Papamichael, 2000*). En 2003, el grupo de *Theodoridou*, estudió su posible utilidad en pacientes con LES, y a pesar de tratarse de pacientes jóvenes (media de edad de 39 años), el 37% mostraban un ITB patológico.

Otro de los métodos de detección de arterioesclerosis subclínica, es la determinación de la **velocidad onda de pulso (VOP)**, generalmente carotídeo -femoral o brazo-tobillo, que mide la elasticidad arterial, cuyas alteraciones pueden traducir de forma precoz cambios que predispongan al desarrollo de patología vascular. Este método comenzó a utilizarse de manera pionera por el grupo de *Selzer, 2001*, que

concluye que en todos los grupos de edad, en las mujeres con LES estudiadas, la VOP, y por tanto la rigidez arterial, está aumentada y correlacionaba con numerosos factores de riesgo cardiovascular de los pacientes, principalmente con la edad, tensión arterial sistólica (TAS), enfermedad renal y marcadores de actividad lúpica. Los mismos resultados los obtienen *Tso, 2005* y *Bjarnegård, 2006*. En 2004, *Selzer*, demostró que la presencia de placa carotídea, grosor íntima-media arterial y la velocidad onda de pulso están significativamente correlacionadas. *Vlachopoulos, 2010*, en el metaanálisis publicado de 17 estudios, reveló que un incremento de la VOP de 1 m/s puede aumentar el riesgo cardiovascular en más de un 14%. En un trabajo español de *Sabio, 2009*, se diseñó un estudio para comprobar la relación entre el síndrome metabólico (SM) y la VOP en pacientes con LES, como marcadores subrogados de arterioesclerosis subclínica. Concluyó que los pacientes con LES y síndrome metabólico tenían mayor VOP que los que no presentaban SM, sugiriendo que el SM contribuye al desarrollo de arterioesclerosis en el LES. *Shang, 2008*, evaluó la relación entre la elasticidad arterial, la actividad de la enfermedad y el daño orgánico producido por la enfermedad. Los pacientes tenían incrementada la VOP en comparación con los controles y se correlacionaba con el índice de actividad del LES (SLEDAI) y con el índice de daño orgánico (SLICC/ACR).

La alteración del endotelio es el estadio precoz de la patogénesis de la arteriosclerosis subclínica (*Ross, 1999*). Varias técnicas validadas en la población general, miden la respuesta de la célula endotelial a estímulos farmacológicos o fisiológicos. Medir la vasodilatación arterial mediada por óxido nítrico en respuesta a la isquemia inducida mediante un manguito de presión es una de ellas. Trabajos como los de *Selzer, 2001*; *Lima, 2002*; *El-Magadmi, 2004* o *Valdivieso, 2008*, demuestran esta

disfunción endotelial mediante disminución de la dilatación mediada por flujo (DMF), en pacientes con LES.

Otros grupos, como el de *Bruce, 2000* y *Nikpour, 2009*, utilizan estudios de **perfusión miocárdica mediante SPECT** (Single Photon Emission Computed Tomography), sugiriendo que la presencia de un defecto de repleción en los pacientes con LES es un predictor de enfermedad coronaria. Sin embargo, al realizar a los pacientes con dicho defecto una arteriografía, únicamente se identificaron estenosis significativa en el 38% de los pacientes, traduciendo poca especificidad.

Todo lo anterior explica el papel crucial de la arteriosclerosis en el LES, probablemente relacionado con el hecho de que la actividad lúpica y la formación de la placa de ateroma comparten mecanismos etiopatogénicos comunes.

1.3. El papel de la enfermedad lúpica en la arteriosclerosis subclínica

Muchas son las evidencias que apuntan a que el incremento del riesgo cardiovascular no sólo se debe a una mayor prevalencia de factores de riesgo clásicos, sino que existe un factor adicional que es la propia enfermedad lúpica y los factores relacionados con ella. En este sentido, una alta puntuación en las escalas de daño orgánico y el tiempo de la evolución de la enfermedad se asocian con enfermedad cardiovascular precoz, independientemente de los factores de riesgo clásico.

Existen múltiples estudios que relacionan mayor puntuación en la escala de **índice de daño orgánico (SLICC/ACR)** con la presencia de estenosis coronaria en la angiografía (*Sella, 2003*), con incremento en el GIM (*Manzi, 1999*) y con la existencia de placa carotídea mediante ecografía (*Roman, 2003*). Menos evidencia existe con la actividad de la enfermedad, aunque *Shang, 2008* y *Tso, 2006*, determinaron que el incremento de la VOP que se objetiva en las pacientes con LES se correlacionaba no solo con el índice SLICC/ACR, sino también con el **índice de actividad del LES (medido por SLEDAI)**.

Selzer, 2004, relacionó el aumento de la VOP con niveles elevados de **complemento C3**, niveles bajos de **leucocitos** y presencia de **enfermedad renal**. *Maksimowickz, 2006*, identificó como factores de riesgo independientes para el desarrollo de arteriosclerosis, los niveles de C3 elevados y una puntuación superior a 3 puntos en el índice SLICC/ACR. Estos datos sugieren que quizá los pacientes que desarrollan arterioesclerosis, no son aquellos que tienen enfermedad más activa (*Selzer, 2004*). Por su parte, *Urowitz, 2007b*, identificó la presencia de vasculitis y la afectación neuropsiquiátrica como factores de riesgo asociados al LES.

En cuanto al papel del **tratamiento** en el desarrollo de arterioesclerosis en pacientes con LES, parece razonable pensar que los corticoesteroides están implicados, ya que aumentan, la tensión arterial, la glucemia y el perfil lipídico (*Bulkley, 1975*). Un estudio más reciente (*Karp, 2008*), concluye que por cada aumento de 10 mg en la dosis diaria de prednisona, crece un 16% el riesgo estimado de enfermedad cardiovascular en los siguientes dos años, mientras que por cada 6 puntos que aumenta el SLEDAI, se eleva tan sólo un 5% el riesgo, concluyendo que, tanto la actividad del LES como el tratamiento con corticoides, juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, otros trabajos como el mencionado anteriormente de *Roman, 2003*, demuestran que una terapia más intensa se relacionó con menor placa carotídea al permitir un mejor control de la inflamación.

1.4. Nuevos marcadores biológicos de arteriosclerosis subclínica en LES

1.4.1. Factores solubles

Tanto la arteriosclerosis como el LES son estados inflamatorios que comparten mecanismos comunes en su etiopatogenia. De hecho, la interrelación de muchos mediadores inmunológicos e inflamatorios que intervienen en las dos entidades, podría ser la causa del incremento del riesgo de arteriosclerosis en el LES. Ambas entidades están caracterizados por la existencia de células T activadas, autoanticuerpos circulantes y aumento de la concentración de mediadores proinflamatorios, entre los que destacan el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), reactantes de fase aguda, proteína C reactiva (PCR), velocidad de sedimentación globular (VSG) y endotelina-1 (ET-1). Existen estudios que analizan las concentraciones de estos marcadores de inflamación en el LES, poniéndolo en relación con la presencia de arteriosclerosis subclínica medida por diferentes métodos. *Asanuma, 2006*, concluye que los niveles de interleucina 6 (IL-6) se correlacionan con la calcificación coronaria. *Rho, 2008*, estudió varias citocinas y reactantes de fase aguda y observó que TNF- α estaba aumentado en pacientes con LES en comparación con controles y que TNF- α se asoció con la gravedad de la presencia de placa coronaria determinada mediante TAC. El grupo de *Colombo, 2007*, determinó que los niveles de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) están también aumentados en pacientes con LES y que además se correlacionaban con el GIM. El estudio de *Kuryliszyn-Moskal, 2008*, concluye que los niveles de ET-1 están aumentados en el LES y que además están asociados con la actividad y el curso clínico del LES.

1.4.2. Células progenitoras endoteliales

Las células progenitoras endoteliales (CPE) son las encargadas de mediar en la reparación vascular. Derivadas de la médula ósea, comparten características tanto de las células madre hematopoyéticas como de las células endoteliales. En presencia de daño vascular estas células responden a las señales de éste estímulo migrando a sangre periférica, proliferando y diferenciándose a células endoteliales maduras (*Werner, 2005*). Estos mismos autores describen, en población general, que un descenso en el número de CPE se relaciona con mayor riesgo cardiovascular. En este sentido *Grisar, 2007*, demuestra que los pacientes con factores de riesgo cardiovascular o enfermedades caracterizadas por una arteriosclerosis prematura tienen una reparación vascular aberrante, niveles disminuidos y una funcionalidad anómala de las CPE.

En pacientes con LES, los resultados aún son controvertidos. La mayoría de los autores afirman que estas células están disminuidas en los enfermos lúpicos, e incluso algunos autores han intentado correlacionar la deficiencia de las CPE con el grado de actividad de la enfermedad (*Esdaile, 2001*) y con el desarrollo prematuro de arteriosclerosis (*Westerweel, 2007; Castejon, 2014*).

En algunos trabajos se describe además de esta disminución en el número, un defecto en la funcionalidad de las CPE (*Moonen, 2007*), incluso en pacientes con remisión clínica como en el trabajo de *Westerweel, 2007*. Otros, solo encuentran defecto en la funcionalidad pero no en el número cuando se cuantifican como marcadores de daño endotelial (*Grisar, 2007*).

De manera contraria, el grupo de *Robak, 2009*, determinó que los pacientes lúpicos, tienen un mayor número de CPE en respuesta a la reparación del daño endotelial.

1.5. Relación entre la enfermedad renal, LES y riesgo cardiovascular

El riñón es una de las dianas de afectación del LES. Clásicamente el desarrollo de enfermedad renal es considerado como un factor de riesgo cardiovascular en la población general. En los pacientes con LES, la enfermedad renal y el desarrollo de nefritis lúpica se han asociado con hipertensión e incremento del riesgo de arteriosclerosis. Estudios como el de *Manger, 2003*, concluyen que la proteinuria mantenida está asociada al desarrollo de arteriosclerosis. Otros, como *Maksimowicz-McKinnon, 2006*, identificaron una elevada concentración de creatinina como factor de riesgo cardiovascular. Posteriormente *Thompson, 2008*, concluye que la creatinina es un predictor independiente de progresión del GIM en pacientes con LES, sugiriendo que el daño renal contribuye o es un marcador de progresión de enfermedad cardiovascular.

2. CISTATINA C

En 1961, el grupo de *Clausen*, descubrió una proteína alcalina en líquido cefalorraquídeo que llamaron proteína gamma CSF (CSF, cerebrospinal fluid). Ese mismo año se descubrió una proteína en orina en pacientes con proteinuria (proteína post- gamma) y posteriormente proteínas de las mismas características en la mayoría de los fluidos del organismo (proteína gamma traza), pero no fue hasta 1982, cuando *Grubb*, descubrió que dichas proteínas eran la misma.

En 1984 se aisló una nueva proteína inhibidora de proteinasas (cistatina), que resultó idéntica a la proteína gamma traza. Se llamo Cistatina C, por ser similar a las cistatinas A y B, aisladas en proteínas de clara de huevo y mamíferos (*Randers, 1999*).

El estudio de la estructura del gen que la codifica y de su promotor, localizados en el cromosoma 20, mostró que era una proteína esencial para la viabilidad celular y que se expresaba en una gran variedad de células, asegurando por lo tanto una tasa de producción constante en la mayor parte de células nucleadas, propiedad que la distingue del resto de las cistatinas (*Abrahamson, 1999*).

La cistatina C pertenece a la familia 2 de la superfamilia de las cistatinas humanas (inhibidoras de las cisteína-proteasas), constituida por 11 proteínas (*Filler, 2005; Grubb, 2001*) (Tabla 1).

Familia 1	Familia 2	Familia 3
<i>Cistatinas intracelulares</i>	<i>Cistatinas extracelulares y/o transcelulares</i>	<i>Cistatinas intravasculares</i>
Cistatina A	Cistatina C	Quininógeno de baja masa molar
Cistatina B	Cistatina D	Quininógeno de alta masa molar
	Cistatina E	
	Cistatina F	
	Cistatina G	
	Cistatina S	
	Cistatina SA	
	Cistatina SN	

Tabla 1. Superfamilia de las cistatinas humanas (Filler, 2005).

La presencia de diferentes cistatinas en tejidos orgánicos y fluidos biológicos indica probablemente que cada una posee su propio espectro inhibitorio.

La cistatina C es el inhibidor fisiológico más importante de las proteasas de cisteína endógenas (Rawlings, 1990). Estas proteasas están implicadas en el metabolismo intracelular de proteínas, en el tratamiento proteolítico de las prehormonas, en el catabolismo del colágeno y en la degradación de la matriz celular (Figura 1). La cistatina C juega un papel como modulador de la actividad de las catepsinas (subfamilia de papainasas de las proteasas de cisteína), principalmente B, H, L y S, secretadas por las células dañadas o en proceso de necrosis, las cuales son inhibidas por la cistatina C, lo que la lleva a ser una de las cisteínas más importantes y fundamental para los procesos de **regulación y prevención del potencial daño proteolítico local** (Randers, 1999; Grubb, 2001; Newman, 2002; Seronie-Vivien, 2008).

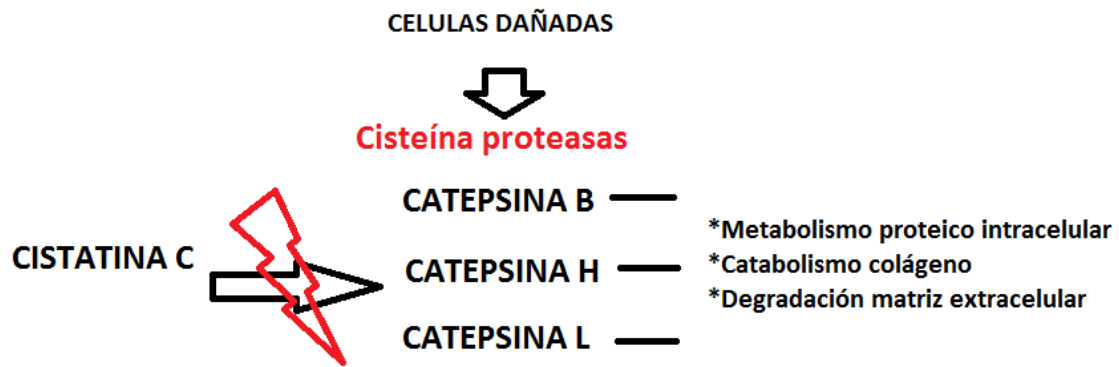


Figura 1: Fisiopatología de la cistatina C.

Además, a la cistatina C se le ha atribuido un papel defensivo en infecciones bacterianas y víricas (*Randers, 1999*).

Su pequeño tamaño y su punto isoelectrico de 9.3 le confiere una carga positiva a pH fisiológico, por lo que se filtra libremente por el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo proximal donde es catabolizada completamente por las células tubulares, no retornando al torrente sanguíneo. Por consiguiente, en ausencia de daño tubular, su concentración en orina es muy baja, de 0.03 – 0.3 mg/L (*Grubb, 2001; Randers, 1999*).

En el año 1985, *Simonsen*, en relación a su función como marcador renal, demuestra que su concentración en suero presentaba una correlación negativa con la tasa de filtrado glomerular (TFG).

Debido a sus características fisiológicas y a que su concentración sérica no se afecta significativamente por cambios en la masa muscular y dieta, la cistatina C se ha propuesto como marcador de filtrado glomerular (FG) superior a la creatinina.

2.1. Determinación de la cistatina C

Desde 1997 el método PENIA *particle-enhanced nephelometric immunoassay* ha sido el más evaluado y frente a él se han comparado la mayoría de los métodos de medida de cistatina C, por lo que es considerado como el método de elección.

Los distintos métodos inmunoquímicos (nefelométricos o a través de técnicas de enzima inmunoensayo (ELISA)) disponibles para cuantificar la cistatina C ofrecen medidas correctas con variaciones mínimas.

Actualmente no se justifica la necesidad de identificar rangos distintos de concentración entre sexos. Tampoco se ha demostrado la existencia de una asociación entre la concentración de cistatina C en suero y la masa muscular.

Algunos estudios describen un incremento de la concentración sérica de cistatina C con la edad, alcanzando valores superiores al 50% después de los 80 años en ambos sexos y en todos los grupos étnicos estudiados (*Köttgen, 2008*). A pesar de encontrar en la literatura valores de referencia ligeramente diferentes según la edad, la mayoría de los autores recomiendan utilizar un único rango de referencia para edades comprendidas entre 1-50 años, y estratificados por edad en menores de 1 año y en mayores de 50 años (*Galteau, 2001; Finney, 2000*).

Aunque la producción de Cistatina C es constante, existen factores que pueden aumentar sus niveles, como la raza (*Stevens, 2009*), el sobrepeso y el tabaco (*Knight, 2004*), la presencia de DM (*Stevens, 2009*) o de hipertiroidismo (*Fricker, 2003; Wiesli, 2003*).

En cuanto a la dosis de glucocorticoides, existen discrepancias entre los autores. *Bjarnadóttir, 1995* y *Risch, 2001* concluyen que dosis altas de glucocorticoides aumentan los niveles de cistatina C, mientras que dosis medias o bajas no modifican el nivel (*Bökenkamp, 2002*). *Pöge, 2004* y *Wasén, 2003*, en pacientes con trasplante de riñón, refieren que dosis mayores de 10mg al día de prednisona, aumentan los niveles de cistatina C. Sin embargo, *White, 2009*, no encuentra asociación entre la cistatina C y la toma de corticoides en estos pacientes y *Silva, 2011*, en su estudio de enfermos con nefritis lúpica, tampoco encuentra correlación y explica que esto pudiera ser debido a que el gen que codifica la Cistatina C estaría ya activado a través de la inducción de su promotor por el uso previo de fármacos.

Las diferencias existentes entre los diferentes estudios podrían explicarse, en parte, por la heterogeneidad de los mismos, ya que existen diferencias en el tamaño y grupo de población estudiada y el método de medida del filtrado glomerular, así como variaciones en los intervalos de referencia de la cistatina C por el método de medida, tipo de anticuerpo y calibrador.

2.2. Relación de la cistatina C con el estado de inflamación

Varios artículos asocian la cistatina C con los marcadores de inflamación basándose en su fisiopatología e implicación en los mecanismos de daño local. *Séronie-Vivien, 2008*, describe la relación directa entre la IL-6, la PCR o el TNF con la cistatina C y además lo pone en el contexto del riesgo cardiovascular. *Stevens, 2009*, relaciona una PCR elevada, así como la leucocitosis y un nivel bajo de albúmina con concentraciones altas de cistatina. *Knight, 2004*, refiere que la concentración de PCR está asociada con una concentración de cistatina C elevada de manera independiente de la función renal. Contrariamente, *Singh, 2007*, indica que la relación entre la cistatina C y los marcadores de inflamación como la PCR y el fibrinógeno no puede desligarse de la función renal.

2.3. Cistatina C como marcador de función renal

El valor de la cistatina C como marcador de función renal es ampliamente conocido y se ha investigado su utilidad en la práctica clínica. En ciertos grupos de pacientes es una opción más adecuada que la creatinina, en otros más rentable y en otros casos, su uso aún controvertido.

En los estadios iniciales de la insuficiencia renal, y principalmente cuando la TFG se encuentra entre 60-89 ml/min/1.73 m², las ecuaciones basadas en la creatinina sérica tienden a infraestimar el FG, en este grupo de pacientes la cistatina C tiene su mayor utilidad.

En los paciente con **DM**, *Mussap, 2002* y *Tang, 2002*, correlacionan de manera directa la concentración de cistatina C con la de albumina en orina y otros autores afirman la asociación de ambos marcadores con la mortalidad (*De Boer, 2009*).

En muchos casos, en relación a las propiedades fisicoquímicas de la molécula, la cistatina C podría ser superior a la creatinina, como en el caso de los **pacientes oncológicos** (*Séronie-Vivien, 2008*), o con **insuficiencia hepática** (*Woitas, 2000; Orlando, 2002*), en los **pacientes críticos** (*Herget-Rosenthal, 2004; Bell, 2009*) o en **otras situaciones** clínicas como en pacientes con anorexia y obesidad (*Delanaye, 2008*), amputados, enfermedades neuromusculares (*Viollet, 2009*), embarazo (*Babay, 2005*) y enfermos con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (*Odden, 2007*).

2.4. Cistatina C como marcador de riesgo cardiovascular y arteriosclerosis

Además de su papel como marcador de función renal, estudios recientes apuntan hacia un papel como marcador de riesgo cardiovascular, aunque aún es controvertido. Múltiples trabajos relacionan a la cistatina C con diferentes factores de riesgo cardiovascular, como el de *Parikh, 2008a*, con la morbilidad cardiovascular como el de *Shlipak, 2005* o con la prevalencia de enfermedad coronaria, IAM, angina e ictus, como el de *Muntner, 2008*.

La posible explicación fisiopatológica de la relación entre la cistatina C y el riesgo cardiovascular es compleja y poco conocida, ya que pocos artículos hacen referencia a ella. *Taglieri, 2009*, refiere que, aunque puede que esta asociación se deba a una posible disfunción renal, la inflamación, asociada a los cambios aterogénicos, también puede ser uno de los mecanismos responsables, ya que altas concentraciones de cistatina C se asocian a niveles de PCR aumentados.

Sin embargo, hay evidencias de que tanto las cisteínas de proteasas como sus inhibidores, entre los que se encuentra la cistatina C, se involucrarían de manera directa en la patogénesis de la arteriosclerosis y que, tanto los niveles circulantes, como el desequilibrio entre las proteasas y sus inhibidores, determinarían sus efectos en el sistema cardiovascular. Citoquinas inflamatorias asociadas con la arteriosclerosis, estimularían la producción de catepsinas lisosomales (proteasas), las cuales están implicadas en la progresión, composición y ruptura de la placa de ateroma. Ello llevaría al aumento de los niveles de cistatina C, inhibiendo las catepsinas para reestablecer el

equilibrio de un potencial daño proteolítico. Además, todo ello probablemente esté influenciado por factores genéticos (Figura 2).

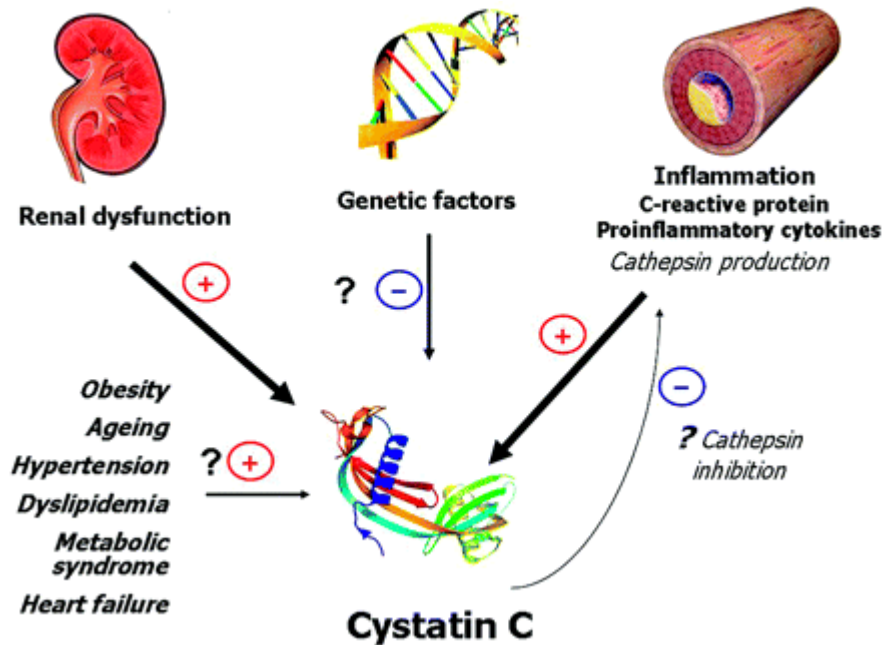


Figura 2: Mecanismos propuesto por Taglieri, 2009 que relacionan la disfunción renal, la inflamación, la aterogénesis y los eventos cardiovasculares.

Recientemente en 2012, Li, explica que en las células cardíacas dañadas o en aquellos vasos con arteriosclerosis, se produce una sobreexpresión de catepsinas, B, H, L (cisteína proteasas, diana de inhibición de la cistatina C), y otras K y S, en las células endoteliales. Todo ello lleva a la activación, liberación y modificación de los factores de crecimiento, liberación de citoquinas, migración, invasión, proliferación y apoptosis, angiogénesis y degradación de la matriz extracelular (Figura 3).

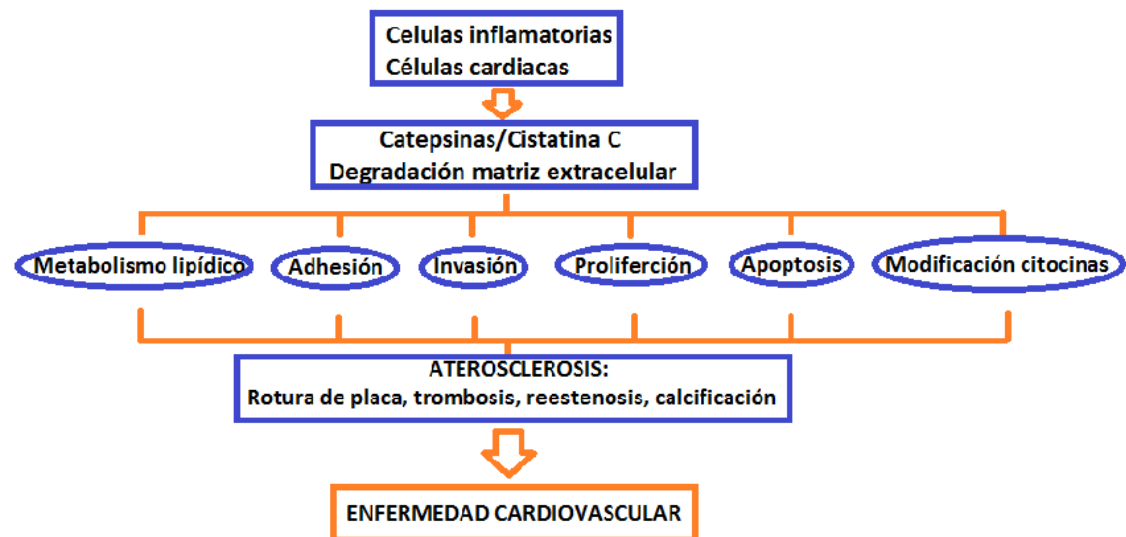


Figura 3 Adaptada de Li, 2012. Relación entre la cistatina C y la arteriosclerosis.

2.5. La relación de la cistatina C con el riesgo cardiovascular en pacientes con lupus eritematoso sistémico

Múltiples estudios posteriores en diferentes poblaciones han continuado estudiando el papel de la cistatina C como marcador de riesgo cardiovascular, con diferentes resultados.

En el caso de las enfermedades reumatológicas, cuyos pacientes presentan características que pudieran alterar los niveles de la concentración de cistatina C, como el grado de inflamación o la toma de corticoides, los resultados también son controvertidos. Mientras que algunos autores afirman que en LES niveles elevados de cistatina C son predictores de mortalidad cardiovascular (*Gustafsson, 2012*), otros como *Lertnawapnan, 2012*, concluyen que la cistatina C no se relaciona con la arteriosclerosis.

A la vista de los pocos estudios y asumiendo la complejidad de la relación LES-arteriosclerosis, consideramos de interés investigar, en una muestra de pacientes con LES, la utilidad de la cistatina C como marcador de función renal y de riesgo cardiovascular.

OBJETIVOS

Los pacientes con LES presentan un mayor riesgo cardiovascular, no solo por el hecho de tener más factores de riesgo que la población general, sino por la presencia de otros que guardan relación con la actividad inflamatoria crónica propia de la enfermedad, así como con los tratamientos recibidos. Es por ello, y por la implicación en el pronóstico, que la detección de la aterosclerosis subclínica es de gran importancia.

La cistatina C es un inhibidor de cisteína proteínasas que se ha propuesto como un marcador de función renal más sensible que la creatinina. En los últimos años, se ha sugerido como posible marcador de riesgo cardiovascular.

Pocos trabajos hacen referencia al papel de la cistatina C en el lupus. Parece razonable investigar si en este grupo de pacientes la cistatina C es una medida sensible de la función renal y si además, podría tratarse de un nuevo marcador independiente de arteriosclerosis subclínica.

Los **objetivos generales** de este trabajo de investigación son:

1.- Valorar la utilidad de la cistatina C como marcador de función renal en pacientes con LES, a través de:

- A. La correlación con los marcadores de función renal clásicos como la creatinina, la urea y las diferentes ecuaciones de medida de la tasa de filtrado glomerular basal, MDRD-4 y CKD-EPI.
- B. La relación con la microalbuminuria, medida por el cociente microalbúmina/creatinina, como marcador de daño estructural renal.

2.- Valorar la utilidad de cistatina C en pacientes con LES como marcador de riesgo cardiovascular precoz, a través de la correlación con:

- A. Factores de riesgo cardiovascular clásicos y marcadores inflamatorios.
- B. Nuevos marcadores biológicos: células progenitoras endoteliales circulantes.
- C. Factores relacionados con el LES.
- D. La arterioesclerosis subclínica determinada mediante la velocidad onda de pulso y el grosor íntima-media.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

Se incluyeron en el estudio un total de 61 mujeres diagnosticadas de LES procedentes de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda.

Los criterios de inclusión de los pacientes eran cumplir al menos cuatro criterios del American Collage of Rheumatology (ACR) para la clasificación de LES (tabla 2) y presentar una tasa de filtrado glomerular (MDRD-4 y CKD-EPI) $> 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$, con la intención de eliminar el sesgo de aquellos pacientes que presentaran aumentado el riesgo cardiovascular dependiente de la alteración de la función renal.

CRITERIO	DEFINICIÓN
1. Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, tendiendo a expandirse a los pliegues nasolabiales.
2. Eritema discoide	Placas elevadas eritematosas con descamación queratósica adherente y taponamiento folicular. Pueden quedar cicatrices atróficas en lesiones antiguas.
3. Fotosensibilidad	Eritema en la piel como resultado de una reacción inusual a la luz solar.
4. Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, normalmente sin dolor, observada por un especialista.
5. Artritis	Artritis no erosiva afectando a 2 o más articulaciones periféricas, caracterizadas por dolor, tumefacción o derrame.
6. Serositis	a) <i>Pleuritis</i> : historia convincente de dolor pleurítico o roce, oído por un especialista o evidencia de derrame pleural.

	b) <i>Pericarditis</i> : documentada por electrocardiograma, roce o evidencia de derrame pericárdico.
7. Alteración renal	a) <i>Proteinuria</i> persistente >0,5gr/día o >3+ si no se cuantifica. b) <i>Cilindros celulares</i> : deben ser células rojas, hemoglobina. Pueden ser granulares, tubulares o mixtos.
8. Alteración neurológica	a) <i>Convulsiones</i> . b) <i>Psicosis</i> . Ambos en ausencia de fármacos o alteraciones metabólicas conocidas como uremia, cetoacidosis o alteraciones de electrolitos.
9. Alteración hematológica	a) <i>Anemia hemolítica</i> con reticulocitosis. b) <i>Leucopenia</i> <4.000/Ml en 2 o más ocasiones. c) <i>Linfopenia</i> <1.500/mL en 2 o más ocasiones. d) <i>Trombopenia</i> <100.000/mL en ausencia de fármacos.
10. Alteración inmunológica	a) célula LE positiva. b) anticuerpos anti-ADN nativo con un título anormal. c) anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm d) test falso positivo para sífilis, siendo positivo durante al menos seis meses y confirmado por inmovilización de <i>treponema pallidum</i> o test de absorción con anticuerpo treponémico fluorescente.
11. Anticuerpos antinucleares	Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o una técnica equivalente, en cualquier momento y en ausencia de fármacos asociados a “lupus inducido por fármacos”.

Tabla 2: Criterios de ACR para la clasificación de LES

Se excluyeron todas aquellas pacientes con enfermedad cardiovascular previa, definida como la presencia de enfermedad coronaria (infarto de miocardio o angina), cerebral (accidente isquémico transitorio o ictus) o arteriopatía periférica y las pacientes con test de embarazo positivo.

No se excluyeron las pacientes con síndrome antifosfolípido al considerar que los eventos cardiovasculares en estas pacientes son por fenómenos trombóticos.

Tanto el consentimiento informado como el diseño del estudio fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio.

2. PROTOCOLO Y DISEÑO

Se trata de un estudio prospectivo en el que haciéndolo coincidir con una visita a la consulta, a todas las pacientes se realizó, una historia clínica y exploración física incluyendo peso, talla, índice de masa corporal (IMC), perímetro abdominal y tensión arterial (TA). Para la medida de la tensión arterial se realizaban tres mediciones en reposo, obteniéndose después la media de las tres tomas.

Se extrajo a todas ellas una muestra de sangre para la determinación de parámetros bioquímicos, inmunológicos, factores asociados con la actividad de la enfermedad y estimación de marcadores biológicos. Además, todas aportaron una muestra de la primera orina de la mañana.

Se realizó una determinación de la concentración de Cistatina C sérica mediante la técnica de inmunonefelometría y una determinación en sangre periférica de los diferentes marcadores biológicos de arteriosclerosis subclínica propuestos en pacientes con LES.

Los análisis se realizaron en los laboratorios de Bioquímica, Hematología, Inmunología y Autoinmunidad de nuestro hospital.

Se realizó además una determinación de la arterioesclerosis subclínica por técnicas no invasivas.

Se obtuvieron otra serie de datos demográficos y clínicos mediante la revisión de la historia clínica de cada paciente, diseñando con todo ello una base de datos.

3. DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

A las pacientes se les preguntó sobre su **hábito tabáquico**, y se clasificaron como no fumadoras (nunca fumadoras o exfumadoras desde hace más de 6 meses) y fumadoras (independientemente del número de cigarrillos).

Se consideró **HTA**, cuando la TAS que estuviera por encima de 140 mmHg y/o la tensión arterial diastólica (TAD) que fuera mayor de 90 mmHg o la paciente estuviera en tratamiento con antihipertensivos.

El diagnóstico de **DM** se calificó si la glucemia en ayunas era ≥ 126 mg/dl o la paciente estaba en tratamiento con antidiabéticos orales o insulina, mientras que se definió glucemia alterada en ayunas cuando la glucemia en ayunas estaba entre 100-125 mg/dl.

Se estimó **hipercolesterolemia** cuando el colesterol total ≥ 190 mg/dl o LDL colesterol ≥ 115 o estuvieran en tratamiento hipolipemiente.

Hipertrigliceridemia se definió como un valor de triglicéridos ≥ 150 mg/dl o recibir tratamiento farmacológico.

Se determinó la **historia familiar de enfermedad cardiovascular**, si la paciente tenía un familiar de primer grado que hubiera sufrido un infarto agudo de miocardio o un ictus antes de los 65 años en mujeres ó 55 años en hombres.

La existencia de **síndrome metabólico** se consideró siguiendo las definiciones de la ATP III (Adult Treatment Panel, 2001) ampliada por la AHA (American Heart

Association, 2005). Según éstas, se consideró como síndrome metabólico si las pacientes cumplían tres o más de los siguientes criterios:

- Circunferencia abdominal > 102 cm en hombres o $>$ de 88 cm en mujeres
- Niveles de triglicéridos ≥ 150 mg/dl o toma de medicación antilipemiente.
- Valores de colesterol HDL < 40 mg/dl en hombres o < 50 mg/dl en mujeres, o toma de medicación hipolipemiente
- TAS ≥ 130 mg/dl o TAD ≥ 85 mg/dl o en tratamiento con antihipertensivos.
- Glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dl o recibir tratamiento antidiabético.

Se calculó el **HeartScore®**, que estima el riesgo de muerte cardiovascular a 10 años, incluyendo el infarto de miocardio e ictus, basado en la edad, sexo, hábito tabáquico, presión arterial, niveles de colesterol total en sangre y la razón de colesterol total/colesterol HDL. Para el cálculo se utilizó la aplicación disponible en la página Web: <http://www.heartscore.org/es/>

Se tuvo en cuenta la **toma de antiagregantes plaquetarios, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II)**.

En la analítica de sangre extraída se incluía la determinación de **glucosa** (valores normales según nuestro laboratorio: 60-100 mg/dl), **hemoglobina glicosilada (Hb A1)** (4,5-6,3%), **colesterol total** (150-200 mg/dl), **colesterol LDL** (70-160 mg/dl), **colesterol HDL** (45-90 mg/dl), **triglicéridos** (30-200 mg/dl), **ácido úrico** (2,5-6 mg/dl), **LDH** (230-460 U/L), **proteínas** (6-8 g/dl) y **albúmina** (3,5-5 g/dl).

4. DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES RELACIONADOS CON EL LES

Se obtuvo de todas las pacientes, mediante la historia clínica, el año de diagnóstico del LES y por lo tanto la **duración de la enfermedad**. Se determinó si la **afectación** era exclusivamente cutánea, visceral o mixta. Para cada una de las pacientes se determinó el grado de **actividad de la enfermedad** teniendo en cuenta cada descriptor recogido en el formulario del “Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index” (SLEDAI). Se definió enfermedad no activa como SLEDAI ≤ 4 (Tabla 3).

VALOR	DESCRIPTOR	DEFINICIÓN
8	Crisis epiléptica	Episodio reciente. Excluir causas metabólicas, infecciosas o inducidas por fármacos.
8	Psicosis	Incapacidad para la actividad normal por alteración de la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, pérdida marcada de asociación, pensamiento empobrecido o ilógico, comportamiento raro, desorganizado o catatónico. Excluir uremia o inducción por fármacos
8	Síndrome orgánico cerebral	Función mental alterada con disminución en la orientación, memoria u otras funciones intelectuales, de rápida aparición y características fluctuantes. Incluye aturdimiento de la conciencia con capacidad reducida para la concentración e incapacidad para mantener la atención, más al menos dos de las siguientes características: alteración de la percepción, habla incoherente, insomnio o somnolencia diurna, actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas metabólicas, infecciosas o inducidas por fármacos
8	Alteración visual	Cambios en la retina. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudado seroso o hemorragias en la coroides o neuritis óptica. Excluir hipertensión, infección o inducción por fármacos
8	Alteración del nervio craneal	Nueva aparición de neuropatía sensorial o motora, implicando a los pares craneales.
8	Cefalea lúpica	Dolor de cabeza grave y persistente. Puede ser migrañoso, pero no debe responder a analgesia narcótica.
8	ACVA	Nuevo accidente cerebrovascular, excluir

		arteriosclerosis
8	Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos en los dedos, infarto periungueal, hemorragias en astilla o biopsia o angiograma con vasculitis probada
4	Artritis	Más de dos articulaciones con dolor y signos de inflamación (tumefacción o derrame).
4	Miositis	Dolor/debilidad muscular proximal, asociado con elevación de CPK/aldolasa o cambios electromiográficos o biopsia demostrando miositis.
4	Cilindros urinarios	Cilindros celulares hemo-granulares o eritrocitarios
4	Hematuria	>5 hematíes/campo. Excluir cálculos, infección u otras causas.
4	Proteinuria	> 0,5 g/24h. Nuevo episodio o incremento reciente de > 0,5 g/24h
4	Piuria	> 5 leucocitos/campo. Excluir infección.
2	Nuevo eritema	Nuevo episodio o recurrencia de eritema de tipo inflamatorio
2	Alopecia	Nuevo episodio o recurrencia de pérdida de pelo anormal, en mechones o difuso.
2	Úlceras mucosas	Nuevo episodio o recurrencia de ulceración oral o nasal.
2	Pleuritis	Dolor torácico pleurítico con roce, derrame, o engrosamiento pleural
2	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos una de las siguientes características: roce, derrame, o confirmación mediante ECG o ecocardiograma.
2	Complemento bajo	Disminución de CH50, C3 o C4 por debajo del límite inferior normal según el laboratorio.
2	Aumento de unión de ADN	> 25% de unión por el ensayo de Farr, o por encima del rango normal según el laboratorio.
1	Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1	Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/mm ³ .
1	Leucopenia	< 3.000 leucocitos/ mm ³ . Excluir la causada por fármacos.

Tabla 3: Formulario del índice de actividad de la enfermedad en LES (SLEDAI)

El **daño orgánico** se evaluó mediante el “Systemic Lupus Internacional Collaborating Clinics/ American Collage of Rheumatology Damage Index” (SLICC/ACR) que incluye una evaluación de 12 órganos que se detalla en la Tabla 4 (Gladman, 1996).

ORGANO AFECTADO	VALOR	DEFINICIÓN
Ocular	1	Cataratas en algún momento en cualquier ojo (documentada por oftalmoscopio).
	1	Cambios en la retina o atrofia óptica (documentados por oftalmoscopio).
Neuropsiquiátrico	1	Déficit cognitivo (déficit de memoria, dificultad para el cálculo, concentración disminuida, dificultad para hablar o escribir) o psicosis mayor.
	1	Convulsiones necesitando tratamiento al menos 6 meses.
	1 (2)	Accidente cerebrovascular (puntuación de 2 si más de 1 episodio) o resección quirúrgica por causa no maligna.
	1	Neuropatía craneal o periférica (excluyendo óptica).
	1	Mielitis transversa.
Renal	1	Filtrado glomerular estimado o medido < 50%.
	1	Proteinuria $\geq 3,5$ g/24h.
	3	Enfermedad renal terminal (independientemente de diálisis o trasplante renal).
Pulmonar	1	Hipertensión pulmonar
	1	Fibrosis pulmonar (examen físico o radiológico)
	1	Pérdida de volumen pulmonar (radiológico)
	1	Fibrosis pleural (radiológico)

	1	Infarto pulmonar (radiológico) o resección quirúrgica por causa no maligna.
Cardiovascular	1	Angina o bypass coronario.
	1 (2)	Infarto de miocardio (puntuación de 2 si más de 1 episodio).
	1	Miocardiopatía con disfunción ventricular.
	1	Valvulopatías (soplo diastólico o sistólico >3/6).
	1	Pericarditis con tratamiento > 6 meses o pericardiectomía.
Vascular periférico	1	Claudicación > 6 meses.
	1	Pérdida de tejido menor (ulceración de pulpa de los dedos) por mala circulación periférica.
	1 (2)	Pérdida de tejido significativa (pérdida de dedos) por mala circulación periférica
	1	Trombosis venosa con ulceración, inflamación o estasis venoso.
Gastrointestinal	1 (2)	Infarto o resección de parte del intestino, bazo, hígado o vesícula por cualquier causa (puntuación de 2 si >1).
	1	Angina mesentérica
	1	Peritonitis crónica.
	1	Estenosis esofágica o cirugía del tracto gastrointestinal superior.
	1	Insuficiencia pancreática que precise sustitución enzimática.
Músculo-esquelético	1	Debilidad o atrofia muscular.
	1	Artritis erosiva o deformante (incluye deformidades reversibles).
	1	Osteoporosis con fractura o colapso vertebral
	1(2)	Necrosis avascular (diagnosticada por técnica de imagen) (puntuación de 2 si más de 1 articulación).

	1	Osteomielitis.
	1	Rotura tendinosa
Piel	1	Alopecia crónica cicatricial.
	1	Cicatrices extensas o paniculitis distintas al cuero cabelludo o pulpejos
	1	Ulceración de la piel (excluyendo trombosis) por más de 6 meses
Fallo gonadal prematuro	1	Amenorrea secundaria antes de los 40 años
Diabetes Mellitus	1	Independientemente del tratamiento.
Cáncer	1 (2)	Excluyendo displasia (puntuación de 2 si más de 1 sitio).

Tabla 4: Formulario del índice de daño acumulado en LES (SLICC/ACR)

De la analítica extraída a todas las pacientes se determinó un hemograma: **leucocitos** (4-11,5 x10E3/microL), **linfocitos** (1,2-4 x10E3/microL), **neutrófilos** (1,5-7,5 x10E3/microL), **monolitos** (0,2-1 x10E3/microL), **eosinófilos** (0-0,4 x10E3/microL), **basófilos** (0-0,2 x10E3/microL), **plaquetas** (150-400 x10E3/microL), **hemoglobina** (12-16 g/dl), **VCM** (82-97 fL), **actividad protrombina** (70-120%), **TTPA** (29,2-39 seg) y pruebas inmunológicas relacionadas con el LES, como la **velocidad de sedimentación globular** (0-25 mm), **anticuerpos antinucleares** (inmunofluorescencia; ANA, positivo si >1/40) y su patrón, **anticuerpos anti-ADN** (ELISA, positivo si > 15 U/ml), niveles de **C3** (90-180 mg/dl), **C4** (10-40 mg/dl), **anticuerpos anti-ENA** (ELISA) y su especificidad, **anticoagulante lúpico** (veneno de víbora de Russell; ratio confirmatorio 0-1,12), **anticuerpos anticardiolipina** (ELISA; IgM, IgG; positivo si >18 U/ml) y **anticuerpos anti-β2glicoproteína 1** (ELISA; IgM, IgG; positivo si >18 U/ml).

Se registró el **tratamiento específico de LES** que estaban recibiendo los pacientes en el momento del estudio, considerando éste como el tratamiento recibido en los 3 últimos meses. Se definió tratamiento inmunosupresor como la toma habitual de cualquiera de los siguientes: corticoides, micofenolato de mofetilo (MMF), ácido micofenólico, ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida o metotrexato.

5. DETERMINACIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS

Se determinaron los siguientes marcadores inflamatorios: **homocisteína** (nefelometría; 4,6-12,5 $\mu\text{mol/L}$), **proteína C reactiva** (inmunoturbimetría; 0,1-10 mg/L), **dímero D** (inmunoturbimetría; 0,1-0,5 $\mu\text{g/L}$) y **fibrinógeno** (método derivativo; 150-450 mg/dl).

6. MEDIDA DE LA FUNCIÓN Y DAÑO ESTRUCTURAL RENAL DE LOS PACIENTES

Se analizaron los niveles de **urea** (21-50 mg/dl), **creatinina** (0.5-0.9 mg/dl) y **cociente microalbúmina /creatinina** (<30 mg/g) como marcador de daño estructural renal.

Se analizó la **tasa de filtrado glomerular** a través de las fórmulas estandarizadas de MDRD-4 y CKD- EPI, para establecer el grado de función renal. A continuación se detallan dichas fórmulas.

- **MDRD:** $\text{GFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 175 \times (\text{S}_{\text{cr}})^{-1.154} \times (\text{Edad})^{-0.203} \times (0.742 \text{ si mujer}) \times (1.212 \text{ si afroamericano})$

- **CKD-EPI:** $\text{GFR} = 141 \times \min(\text{S}_{\text{cr}}/\kappa, 1)^{\alpha} \times \max(\text{S}_{\text{cr}}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{Edad}} \times 1.018$
[si mujer] $\times 1.159$ [si afroamericano]

S_{cr} es creatinina sérica en mg/dl,

κ es 0.7 para mujeres and 0.9 para hombres,

α es -0.329 para mujeres y -0.411 para hombres

Se clasificó la presencia de enfermedad renal crónica en base a la clasificación KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes), (Clinical *Practice Guidelines for Acute Kidney injury*, 2012). Se trata de una versión ampliada de la clasificación clásica en la que se tiene en cuenta la albuminuria en dichos pacientes para establecer el pronóstico de la enfermedad renal crónica (Figura 4).

Pronóstico de ERC por IFR y categorías de Albuminuria: KDIGO 2012				Categorías de Albuminuria Descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Aumento normal o	Aumento moderado	Aumento Severo
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-299 mg/g 3-29 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
Categorías de IFR, Descripción y Alcance (mL/min/1,73 m ²)	G1	Normal o elevado	>90			
	G2	Descenso leve	60-89			
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
	G3b	Descenso moderado-	30-44			
	G4	Descenso severo	15-29			
	G5	Fallo renal	<15			

Nota: Los colores mostrarían el riesgo relativo ajustado para cinco eventos (mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal) a partir de un metanálisis de cohortes de población general². El riesgo menor corresponde al color verde (categoría "bajo riesgo" y si no hay datos de lesión renal no se puede catalogar siquiera como ERC), seguido del color amarillo (riesgo "moderadamente aumentado"), naranja ("alto riesgo") y rojo ("muy alto riesgo"), que expresan riesgos crecientes para los eventos mencionados.

Figura 4: Clasificación de la enfermedad renal crónica según las guías KDIGO, adaptación en castellano.

7. DETERMINACIÓN DE LA CISTATINA C

La concentración de Cistatina C se analizó en el suero de las pacientes incluidas en el estudio a través de la técnica de inmunonefelometría disponible en nuestro centro. Un haz de luz pasa a través de la cubeta que contiene el complejo antígeno anticuerpo y el nefelómetro mide la cantidad de luz dispersada por el complejo, que es proporcional a la concentración de anticuerpos en un amplio intervalo de concentración. Como la cistatina C es una molécula pequeña, la sensibilidad se incrementó mediante la utilización de partículas sintéticas recubiertas de anticuerpos específicos frente a la cistatina C. Estas partículas de poliestireno, recubiertas de aproximadamente 0.03 g/L anticuerpos procedentes de conejo anti-cistatina C humana, se agregan al mezclarse con las muestras que contienen cistatina C humana formando complejos. La concentración de cistatina C se determina midiendo la dispersión de la luz producida por estos inmunocomplejos y comparando los resultados con un estándar de concentración conocido. El nefelómetro utilizado en nuestro centro fue el sistema BN proSpec (Siemens).

Los valores de Cistatina C se consideraron normales en rango 0.59 ± 1.01 mg/dl, según los estándares y parámetros de actividad de nuestro laboratorio.

8. PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA

8.1. Cuantificación del grosor íntima-media (GIM)

A cada una de las pacientes se les realizó un estudio ecográfico modo B de ambos territorios carotídeos cervicales en el Laboratorio de Hemodinámica Cerebral perteneciente al Servicio de Neurología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Para ello se utilizó un ecógrafo Philips modelo IU22 equipado con EcoDoppler Color y cuantificación automática del GIM. Con la paciente en decúbito supino, se realizó un estudio transversal y longitudinal de la arteria carótida común, bifurcación carotídea, bulbo carotídeo y el segmento proximal de las arterias carótidas externa e interna (los primeros 15 mm), bilateralmente.

En cada sujeto se determinó el GIM en tres diferentes localizaciones de cada arteria carótida común a una distancia de más de 1 cm de la bifurcación, para evitar la existencia de engrosamientos de origen mecánico/turbulento. La cuantificación del GIM se realizó de forma automática mediante el *Software* perteneciente al propio equipo diseñado específicamente para el estudio de este marcador vascular. Para el cálculo del valor medio del GIM, se hicieron las medias aritméticas de las tres determinaciones de cada arteria carótida común y posteriormente se tomó como valor de cada paciente la cifra media entre los valores de ambos lados.

Todas estas determinaciones fueron realizadas por el mismo observador.

8.2. Medida de la elasticidad arterial mediante velocidad de onda de pulso

(VOP)

La elasticidad arterial puede ser medida directamente y de forma no invasiva en varias zonas del árbol arterial. La mayor ventaja de éstas medidas no invasivas es que están basadas en mediciones directas de parámetros fuertemente relacionados con la elasticidad de la pared, como es la velocidad de propagación de la onda de presión originada en la aorta proximal por la eyección del ventrículo izquierdo. La aorta es el mejor vaso cuando queremos determinar la elasticidad arterial por al menos dos razones:

- La aorta torácica y abdominal tienen la mayor contribución a la propagación de la onda de presión.
- La VOP aórtica es un predictor independiente de eventos vasculares en una variedad amplia de población (*Laurent, 2003*).

La medida de la VOP aórtica o en el segmento carótido-femoral (desde la carótida común en región supraclavicular a la arteria femoral en el pliegue inguinal) es aceptada de forma general como el método más simple, no invasivo y reproducible para determinar la elasticidad arterial por su relación matemática con el Modulo de Elasticidad arterial según la **Fórmula de Korteweg**:

$$VOP = \sqrt{(E * e / D * \rho)}$$

Donde: **VOP** en cm/s

E es el módulo de elasticidad (Módulo de Young) en dinas/cm²

e es el espesor de la arteria.

D es el diámetro interior.

ρ es la masa específica del fluido (1,05 para la sangre).

La VOP carótido-femoral ha sido usada en estudios epidemiológicos demostrando el valor predictivo de la elasticidad aórtica para eventos cardiovasculares, por lo que se considera el “gold standard” para la medida de la elasticidad arterial.

Para el cálculo de la VOP, se dispuso de un prototipo de *Software* de análisis morfo-temporal (Jiménez , 2003) para análisis de onda con Velocimetría Doppler, que nos permite conocer el tiempo de llegada en cualquier punto arterial del pie de la onda de velocidad Doppler a partir de la onda R del electrocardiograma (EKG). De este modo, mediante la resta de ambos tiempos, se calcula la diferencia en tiempos que tarda la onda de presión en recorrer el segmento arterial comprendido entre los puntos carotídeo y femoral determinados. Los valores se promediaron de 15 señales consecutivas en cada toma (Figura 5).

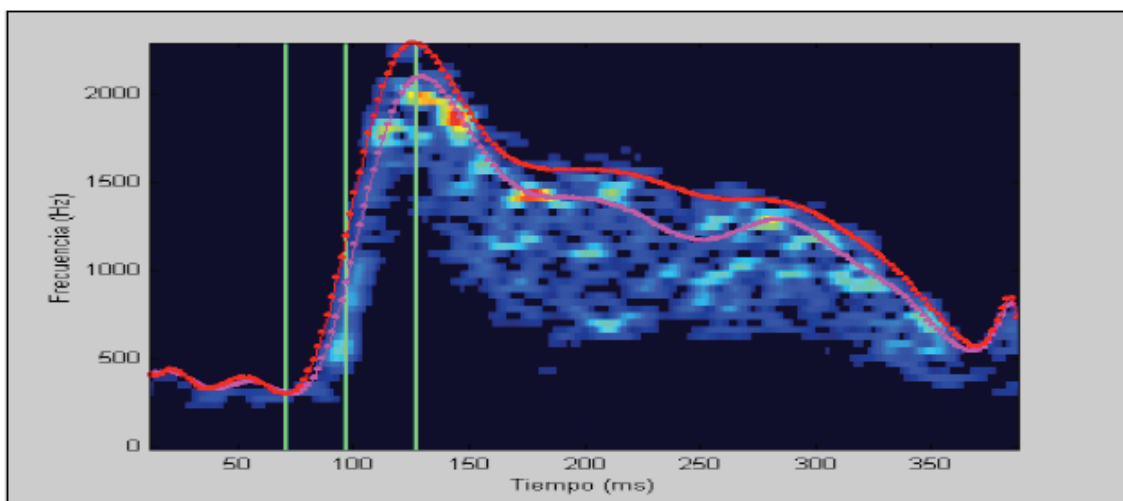


Figura 5: Registro representativo de la onda de velocidad doppler en una paciente.

La distancia entre los puntos de muestreo carotídeo y femoral se determina mediante cinta métrica desde el manubrio esternal hasta la cicatriz umbilical, sumándole la distancia entre este último punto y el punto de determinación de la señal en la femoral en el pliegue inguinal.

Una vez calculada la diferencia de tiempo de tránsito de la onda de pulso entre carótida común y arteria femoral y conocida la distancia entre dichos puntos, la VOP se calcula dividiendo el espacio recorrido en centímetros por el tiempo de tránsito en milisegundos. El valor de la VOP se expresa en metros por segundo.

Antes de la realización del procedimiento, se intentó el cumplimiento de una serie de condiciones para la correcta realización de la prueba: temperatura de la habitación ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), no fumar ni comer al menos desde 3 horas antes del estudio, no consumir alcohol al menos desde 10 horas antes del estudio, no hablar durante el procedimiento y posición de decúbito supino.

9. ESTUDIO Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES Y FACTORES SOLUBLES EN SUERO

9.1. Obtención de las muestras

De cada paciente se extrajeron 20 ml de sangre venosa en tubos Venoject con 150 U de heparina de litio (Terumo Europe N.V.) de la que se obtuvieron las células mononucleares y 10 ml en tubos Vacuette sin anticoagulante (Greiner bio-one GmbH) para la obtención de suero. El procesamiento de las muestras se realizó en las tres horas posteriores a su extracción.

Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

La muestra extraída con heparina, se diluyó al 50% con suero salino fisiológico (B. Braun Medical SA) y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante centrifugación (400g, 30 minutos a temperatura ambiente) en un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep TM, Axis Shield PoC AS) (*Bóyum, 1968*). Se recogió la fase conteniendo las CMSP (linfocitos, monocitos y células NK) y se lavó dos veces con suero salino. La concentración celular se valoró mediante recuento con un microscopio óptico utilizando una cámara de Neubauer.

Obtención del suero

Las muestras de sangre periférica extraídas sin anticoagulante se centrifugaron (800g, 10 minutos a temperatura ambiente), se recogió el suero en varias alícuotas y se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

9.2. Determinación de las células progenitoras endoteliales circulantes

Las células progenitoras endoteliales (CPE) se han definido como una subpoblación celular que coexpresan los marcadores CD34, CD309 (VEGFR-2/KDR en humanos) y CD133. El marcador CD34 lo expresan todas las células progenitoras hematopoyéticas. La expresión del antígeno CD133 parece estar restringida a las CPE más tempranas y se pierde durante el proceso de maduración a células endoteliales. El análisis diferencial de la expresión de estos marcadores permite identificar el estado de maduración de las CPE. La frecuencia de células CD34⁺ que coexpresan KDR y CD133 en la sangre periférica de un individuo sano es tan sólo alrededor del 0,4% del total de la población CD34⁺ (0,002% del total de las CMSP) (*Peichev, 2000*). La cuantificación de esta subpoblación celular tan escasa en sangre periférica se realizó usando una nueva herramienta específicamente diseñada que permite enriquecer la muestra en precursores CD34⁺ por un sistema de selección inmunomagnética (EPC Enrichment and Enumeration Kit, MiltenyiBiotec). Posteriormente, la fracción enriquecida de células CD34⁺ se incubó con suero bloqueante del receptor Fc que inhibe las uniones inespecíficas y con el siguiente coctel de anticuerpos a las concentraciones recomendadas por el fabricante: anticuerpos anti-CD34 (FITC), anti-CD133/2 (293C3) (PE), anti-CD14 (PE-Cy5) y anti-KDR (APC) o con los correspondientes controles isotipo. Tras un lavado con PBS/EDTA, se añadió a la suspensión celular un colorante vital como el ioduro de propidio (IP) que permite excluir del análisis las células necróticas. El análisis de los datos se llevó a cabo con un citómetro FACScalibur y con el software FACSDiva (BD Bioscience) siguiendo las recomendaciones para la detección y cuantificación de CPE con esta metodología (*Khan, 2005*).

Se consideraron células progenitoras endoteliales las triples positivas para el marcaje realizado (CD34+CD133+KDR+) y negativas para el marcaje con CD14 e IP. Del mismo modo, se cuantificó la subpoblación de células progenitoras endoteliales en un estado de maduración avanzado como las células CD34+KDR+CD133- en la región con marcaje negativo para CD14 e IP (Figura 6). Los resultados obtenidos en cada paciente se expresaron como porcentajes en base al conteo de CMSP.

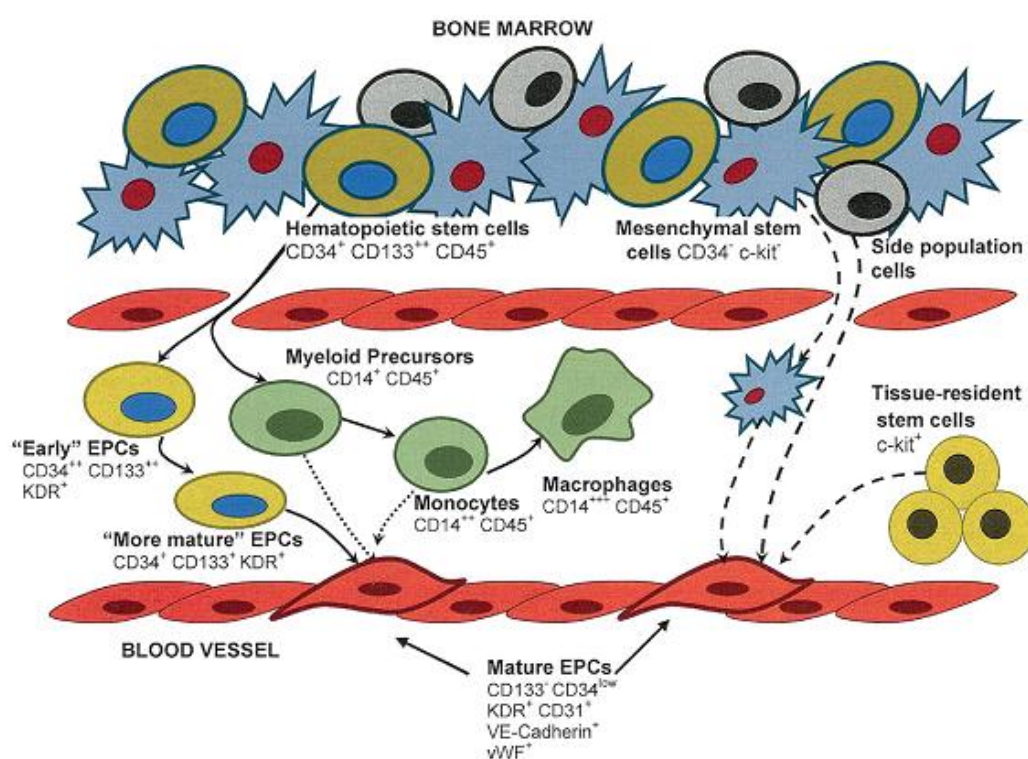


Figura 6: Origen y diferenciación de las células progenitoras endoteliales (Shantsila, 2007).

9.3. Estudio de la expresión de factores solubles en el suero

Se determinó la concentración de los factores solubles implicados en la inflamación y otros considerados como marcadores de activación endotelial y cuya implicación en la disfunción endotelial de los pacientes con LES se ha sugerido en los últimos años. Se cuantificaron los niveles séricos presentes en las muestras de los pacientes con LES incluidas en el estudio de las siguientes proteínas:

–Citocinas inflamatorias: IL-6, IFN γ y TNF.

–Citocinas antiinflamatorias: IL-10.

–Factores de crecimiento: ET-1

La cuantificación de la ET-1 se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Assay designs, Stressgen y R&D System). En la placa que contiene fijado anticuerpo de alta afinidad específico de la proteína a determinar, se incubaron en paralelo ocho concentraciones conocidas de la proteína y una muestra de suero de cada una de las pacientes, durante el tiempo indicado.

Posteriormente se lavó y se incubó de nuevo con un anticuerpo específico de la proteína problema conjugado con peroxidasa. Tras un nuevo lavado para eliminar el exceso de anticuerpo se añadió el sustrato, dando lugar a un producto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de la proteína presente en la muestra. La densidad óptica (DO) se determinó a una longitud de onda de 450nm. Se realizó una recta patrón enfrentando la DO con la concentración de las muestras de las que se conocía la cantidad de proteína y se calculó su concentración de los sueros de las

pacientes extrapolando las DO correspondientes. El rango de detección para la ET-1 fue de 0,008-0,1 ng/ml.

La concentración sérica del resto de proteínas (IFN γ , TNF, IL- 6 e IL-10) se cuantificó mediante citometría de flujo con el método CBA (Cytometric Bead Array) (BD Bioscience), que permite la cuantificación simultánea de varias proteínas con una sensibilidad similar a un ELISA. El sistema emplea una combinación de microesferas fluorescentes unidas covalentemente con anticuerpos dirigidos específicamente frente a las diferentes proteínas solubles que se pretenden determinar. Las microesferas tienen un rango de detección de 0,002-5 ng/ml y el análisis de los resultados se llevó a cabo con el software FCAP Array (BD Bioscience).

10. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Las variables iniciales se describen en tablas con porcentajes y medias, según el tipo de variable. Las variables cuantitativas se resumen con su media y su desviación estándar (DS) o bien con la mediana y el rango intercuartílico en caso de presentar una dispersión elevada. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos. Se realizó un análisis de normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se empleó la prueba t de student en el caso de comparación de dos muestras de variables continuas y la prueba de Mann-Whitney para el mismo tipo de datos si se rechazan dichas hipótesis. Para comparar las variables categóricas se utilizó la prueba χ^2 normal o χ^2 corregida por Yates en el caso de frecuencias esperadas <5 .

Las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante ($p < 0,05$), se analizaron en dos modelos de regresión logística múltiple. Este método de regresión es una técnica para ver la relación entre una variable dependiente binaria (VOP normal/patológica, cistatina normal/patológica) y una serie de variables pronósticos de la enfermedad. Se estimó la “odds ratio” (OR, razón de ventajas) junto a su intervalo de confianza (IC) 95% de cada una de las variables sobre la variable utilizada. La estrategia utilizada en la selección de las variables es la llamada “backward stepwise” que consiste en construir un modelo con todas las variables predictoras e ir eliminando hasta que dejen de cumplir los niveles de significación exigidos por el análisis ($p < 0,15$).

Los datos fueron almacenados en el programa Excel y tratados mediante el paquete estadístico SPSS V.14.0.

RESULTADOS

El estudio se llevó a cabo en 61 pacientes que cumplían al menos 4 criterios de la ACR para la clasificación de LES y que acudieron a una revisión programada en la consulta de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, del servicio de Medicina Interna de nuestro hospital.

De todas las pacientes se obtuvieron datos demográficos y clínicos mediante la revisión de la historia clínica y una exploración física. Se analizaron parámetros bioquímicos, inmunológicos, factores asociados con la actividad de la enfermedad y estimación de marcadores biológicos. Se realizó además una determinación de la arterioesclerosis subclínica por técnicas no invasivas.

Nuestro objetivo es estudiar, por un lado, el papel de la cistatina C como marcador de función renal en pacientes con lupus y por otro, su papel como marcador de riesgo cardiovascular a través de su relación con factores cardiovasculares clásicos, parámetros inflamatorios, marcadores biológicos novedosos de riesgo cardiovascular, como células progenitoras endoteliales, parámetros relacionados con la enfermedad y finalmente, con la arteriosclerosis subclínica, midiendo la rigidez arterial a través de la VOP.

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES

Del total de los 61 pacientes incluidos en el estudio, todas eran mujeres con una edad media de 45.58 ± 13.13 años, mediana 44 [21-80] años.

1.1. Descripción de los parámetros de función renal:

La media de TFG de nuestros pacientes supera los 90 mL/min/1.73 m². De los 61 pacientes analizados, 39 (63.93%) presentaban valores de TFG > 90 mL/min/1.73 m². Los restantes 22 (36%), presentaban una TFG entre 60-90 mL/min/1.73 m². Cinco de las pacientes (8.20%) presentaban albuminuria clínica de >300 mcg/ min, solo una asociada a alteración de la TFG.

El resto de parámetros de función renal determinados se muestran en la tabla 5.

PARÁMETROS DE FUNCIÓN RENAL (n=61)	Valor obtenido	Valor de referencia
Creatinina (mg/dl)	0.71 ± 0.12	0.5-0.9
Urea (mg/dl)	34.34 ± 8.31	21-50
Microalbúmina/creatinina (mg/g)	60.06 ± 153.59	30-299
MDRD-4 ml/min/1.73 m ²	98.56 ± 23.70	>90
CKD-EPI ml/min/1.73 m ²	99.77 ± 18.02	>90
<i>Valores mostrados como media \pm desviación estándar</i>		

Tabla 5: Parámetros de función renal

1.2. Descripción de los factores de riesgo cardiovascular:

En cuanto a los factores cardiovasculares, el factor de riesgo más frecuente fue la hipercolesterolemia (28 pacientes, 45.9%), seguido de tabaquismo (14 pacientes, 23%) e hipertensión arterial (13 pacientes, 21.3%). El riesgo medido a través del HeartScore® era bajo, el 83.61% de los pacientes tenían un riesgo de 1% de muerte cardiovascular en los siguientes 10 años. La puntuación máxima fue de 4 en 3 pacientes que supone un riesgo de 3-4%. La siguiente gráfica muestra estos datos (Figura7).

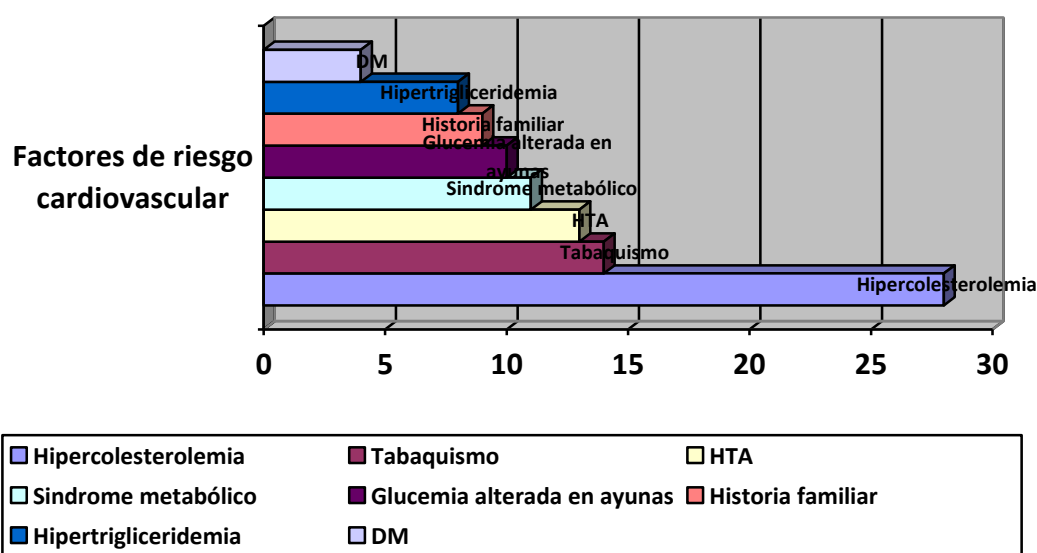


Figura 7: Factores de riesgo cardiovascular de las pacientes incluidas en nuestra muestra, mostrados como porcentajes.

El valor medio de los factores de riesgo cardiovascular, se objetivan en la tabla 6. La media de todas las variables esta dentro de los valores establecidos como normales para cada uno de los parámetros, excepto en el caso de IMC, donde se puede ver que el valor medio fue mayor de 25, indicando sobrepeso.

Pacientes n=61	Valor obtenido	Valor de referencia
<u>PACIENTES CON FACTORES DE RIESGO</u>		
<u>CARDIOVASCULAR</u>		
Síndrome metabólico	11 (18%)	
HTA	13 (21.3%)	
Hipertrigliceridemia	8 (13.1%)	
Historia familiar	9 (14.8%)	
Tabaquismo	14 (23%)	
DM	4 (6.6%)	
Glucemia alterada en ayunas	10 (16.4%)	
Hipercolesterolemia	28 (45.9%)	
Heartscore de 1	51 (83.6%)	
<u>VALOR MEDIO DE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR</u>		
Edad (años)	45.58±13.13	
IMC (kg/m2)	25.11±4.87	18.5-25
Peso (kg)	64.65±13.33	
Perímetro Abdominal (cm)	87.85±14.58	88
TAS (mmHg)	116.36±15.81	120
TAD (mmHg)	72.06±9.00	80
Glucemia basal (mg/dl)	92.43±13.71	60-100
HbA1	5.42±0.50	<6.5
Colesterol Total (mg/dl)	184.75±40.77	150-200
LDL (mg/dl)	108.59±31.90	70-160
HDL (mg/dl)	55.05±17.63	45-90
Triglicéridos (mg/dl)	98.93±69.20	30-200
<i>Valores mostrados como media ± desviación estándar o número y porcentaje</i>		

Tabla 6: Características basales de los pacientes en cuanto al riesgo cardiovascular

En cuanto **al tratamiento con diana cardiovascular**, de los 13 pacientes con HTA, 11 de ellos (84.62%) tenían tratamiento con IECAS. De los 28 pacientes con hipercolesterolemia solo 8 (28.57%), tomaban tratamiento con estatinas; uno de los pacientes que tomaba estatinas no era como tratamiento antilipemiente (Tabla 7).

TRATAMIENTOS CON DIANA CARDIOVASCULAR (n=61)	
IECAS	11 (18%)
ACIDO ACETIL SALICÍLICO	24 (39.3%)
ESTATINAS	9 (14.8%)
<i>Valores mostrados como número y porcentaje</i>	

Tabla 7: Tratamiento con diana cardiovascular

1.3. Descripción de los factores inflamatorios

Para medir de una manera indirecta el estado inflamatorio de nuestros pacientes se escogieron cuatro reactantes de fase aguda, cuyos valores medios, todos en rango de la normalidad, se exponen en la Tabla 8:

REACTANTES DE FASE AGUDA (n=61)	Valor obtenido	Valor de referencia
Proteína C reactiva (PCR) (mg/l)	2.20±4.46	0.1-10
Homocisteína (μmol/l)	11.72±4.26	4.6-12.5
Fibrinógeno (mg/dl)	345.74±70.50	150-450
Dímero D (μg/l)	0.71±2.26	0.1-0.5
<i>Valores mostrados como media ± desviación estándar</i>		

Tabla 8: Reactantes de fase aguda

1.4. Descripción de los factores relacionados con el LES

Respecto a la enfermedad lúpica en nuestros pacientes, la media de años de evolución de la enfermedad fue de 12.41 ± 9.66 años.

Se midieron la actividad sistémica en el momento del estudio y el daño orgánico acumulado a lo largo de los años desde que fueron diagnosticadas. Cincuenta pacientes (82%) no presentaban enfermedad activa, con un SLEDAI ≤ 4 . Dieciocho pacientes (29.5%) no tenían daño orgánico, SLICC/ACR = 0, mientras que 43 pacientes (70.5%) presentaban SLICC/ACR comprendido entre 1 y 6.

Cincuenta y tres pacientes (86.9 %) presentaban enfermedad mixta (cutánea y visceral).

En cuanto a la **actividad serológica de la enfermedad**, 20 pacientes presentaban positividad para anticuerpos anti ADN, 21 pacientes hipocomplementemia, y 10 pacientes (16.7%), mostraban ambos anti ADN e hipocomplementemia a la vez. Seis (10.7%) de las pacientes, presentaban positividad para anticoagulante lúpico, de ellos, 4 (14.3%), cumplían criterios de síndrome antifosfolípido.

Las características clínicas del LES, los parámetros bioquímicos e inmunológicos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 9).

FACTORES RELACIONADOS CON LES (n=61)	Valor obtenido	Valor de referencia
Años de evolución	12.41±9.66	
Leucocitos (x µl)	5616.56±1871.04	4.0-11.5
Linfocitos (x µl)	1500.82±508.44	1.2-4.0
Plaquetas (x µl)	226081.97±64119.237	150-400
VSG (mm)	14.59 ±11.62	0-25
SLEDAI	2.18±2.53	
SLICC/ACR	1.57±1.53	
C3 (mg/dl)	104.38±28.05	
C4 (mg/dl)	17.31±8.54	
Hipocomplementemia (%)	34.4 %	
ANA (% positivo)	90 %	
Anti—ADN (% positivo)	33.3 %	
Anti—ENA (%positivo)	50 %	
Anticoagulante lúpico (% positivo)	10.7 %	
Anticuerpos anticardiolipina (% positivo)	21.3 %	
Anticuerpos anti β2glicoproteína (% positivo)	16.4 %	
<i>Valores mostrados como media ± desviación estándar o porcentaje</i>		

Tabla 9: Factores relacionados con el LES.

A continuación se describe el **tratamiento para la enfermedad lúpica** que tomaban estas pacientes. De las 61 pacientes, 8 (13.11%) no tomaban ningún tratamiento. De las 53 pacientes (86.89%) que tenían tratamiento, 30 (56.60%) tomaban tratamiento inmunosupresor (IMS) más antimaláricos (ANTIM), veintiuno (39.62%) solo antimaláricos y únicamente dos solo inmunosupresores. Señalar que 30 pacientes

(49.18%) estaban en tratamiento con esteroides. En la tabla adjunta se especifican los tratamientos (Tabla 10).

TIPO DE TRATAMIENTO	Número de pacientes
ANTIMALÁRICOS	21
ANTIMALÁRICOS + IMS	30
Antim + MFM	2
Antim+Corticoides	13
Antim+Corticoides+Azatioprina	4
Antim+Corticoides+MFM	8
Antim+Corticoides+MTX	3
INMUNOSUPRESORES	2
Corticoides	1
Corticoides +MFM	1
IMS: inmunosupresores; ANTIM: antimaláricos; MFM: micofenolato de mofetilo; MTX: metotrexate	

Tabla 10: Tratamiento relacionado con el LES.

2- DETERMINACIÓN DE CISTATINA C

Los niveles de Cistatina C, se midieron en el laboratorio de bioquímica de nuestro hospital a través del método nefelometría, estableciendo por su parte un rango de normalidad entre los valores 0.59-1.01 mg/l. En base a ello, se consideraron valores de cistatina C normales cuando ésta era menor de 1.01 mg/l, y elevada cuando eran superiores a dicho valor. La media del valor total fue 0.80 ± 0.27 mg /l [0.44-1.9].

Diez de los 61 pacientes (16.40%) tenían un valor de Cistatina C elevado, superior a 1.01 mg /l, con una media de 1.30 ± 0.78 mg/l. El resto de los pacientes, 51 contaban con valores normales de la cistatina C, con un valor medio de 0.70 ± 0.19 mg/l.

3- CISTATINA C COMO MARCADOR DE FUNCIÓN RENAL EN PACIENTES CON LES

Para determinar la funcionalidad de la cistatina C como marcador de función renal en nuestros pacientes, se correlacionó con los niveles de creatinina, urea y microalbuminuria, mediante el cociente microalbúmina/creatinina. Para la medida de la tasa de filtrado glomerular, parámetro de medida de la función renal, se utilizaron las dos ecuaciones, Modification of Diet in Renal Disease (MDRD), y Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI).

Al clasificar los pacientes en aquellos que tenían una Cistatina C normal (< 1.01 mg/dl) o alterada, por encima del valor superior (1.01 mg/l), se objetivó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en todas las variables referidas, por lo que aquellos pacientes con una cistatina C elevada además eran aquellos que contaban con peores parámetros renales, incluida la microalbuminuria (Tabla 11).

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
Creatinina	0.69±0.10	0.85±0.14	0.001
Urea	33.10±7.92	40.70±7.62	0.015
Microalbúmina/creatinina	14.39±27.34	288.43±284.67	< 0.0001
MDRD-4	102.73±22.88	77.25±15.21	< 0.0001
CKD-EPI	103.44±16.45	81.03±13.89	< 0.0001
<i>Los datos se muestran como media± desviación estándar y significación estadística</i>			

Tabla 11: Cistatina C y marcadores de función renal

Por otro lado, se objetivó una **correlación** directa de la concentración de cistatina C con la creatinina ($r=0.45$, $p=0.001$) e inversa con las medidas de tasa de filtrado glomerular (MDRD-4: $r=-0.44$, $p=0.001$; CKD-EPI: $r=-0.72$, $p=0.001$), es decir, a mayores niveles de cistatina, mayores valores de creatinina y menor tasa de filtrado glomerular por ambas fórmulas y peor función renal. Sin embargo, no se observó correlación con el nivel de urea o el cociente microalbúmina/creatinina. Aunque los pacientes con más concentración de cistatina C presentaban tendencia a mayor concentración de microalbúmina creatinina (Figura 8), en nuestra muestra no alcanza la significación estadística, probablemente por el tamaño muestral.

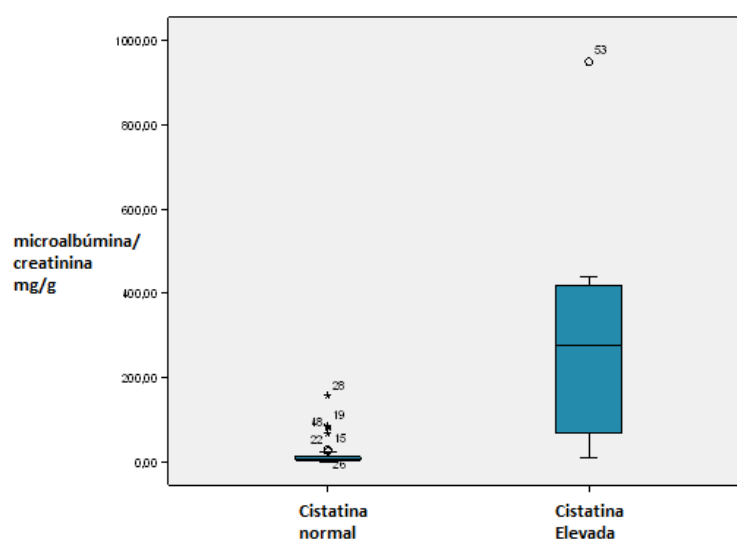


Figura 8: Relación entre la Cistatina C y el cociente microalbuminuria creatinina.

Ocho pacientes con creatinina normal, tenían una cistatina C elevada, mientras que no hubo pacientes que presentaran una cistatina normal y una creatinina patológica ($p = 0.025$); sugiriendo mayor sensibilidad de la cistatina C como marcador renal (Tabla 12).

	Creatinina <0.9 mg/dl	Creatinina >0.9 mg/dl	Total
Cistatina normal	51	0	51
Cistatina elevada	8	2	10
Total	59	2	61

Tabla 12: Cistatina C y creatinina. Los valores se muestran como número de pacientes.

4. CISTATINA C COMO MARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON LES

4.1. Asociación de la cistatina C con factores de riesgo cardiovascular

Dentro de los factores de riesgo cardiovascular clásicos cualitativos, los pacientes con cistatina C elevada, presentaban mayor síndrome metabólico, HTA, hipertrigliceridemia y tabaquismo. El resto de factores, con los que no se pudo establecer una relación figuran en la Tabla 13.

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
Síndrome metabólico (n= 11)	4 (36.36)	7 (63.63)	< 0.001
HTA (n= 13)	5 (38.46)	8 (61.54)	< 0.001
Hipertrigliceridemia (n= 8)	2 (25)	6 (75)	< 0.001
Historia familiar (n=9)	9 (100)	0 (0)	0.169
Tabaquismo (n= 14)	9 (64.29)	5 (35.71)	0.041
DM (n=4)	1 (25)	3 (75)	0.12
Glucemia alterada en ayunas (n=10)	9 (90)	1 (10)	0.479
Hipercolesterolemia (n=28)	21 (71.43)	7 (25)	0.093
Heartscore de 1 (n=51)	1.28 ± 0.77	1.33 ± 0.71	0.655

Los datos se expresan como número y porcentaje o media ± desviación estándar

Tabla 13: Cistatina C y factores de riesgo cardiovascular.

En cuanto a los factores de riesgo cardiovascular cuantitativos, se objetiva que los pacientes con cistatina C elevada, presentan mayor IMC, peso y triglicéridos, y en este caso también mayor perímetro abdominal, tensión arterial sistólica y diastólica y colesterol total, pero no de HDL ni LDL colesterol. La relación de la edad con la cistatina C no fue significativamente diferente entre grupos (Tabla 14).

<i>Variables</i>	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
Edad	44.30±13.14	52.10±11.53	0.108
IMC	24.22±4,18	29.64±5.81	0.006
Peso	62.34±10.66	76.44±19.21	0.011
Perímetro Abdominal	84.71±12.59	103.90±13.98	< 0.0001
TAS	113.15±13.41	132.75±17.62	< 0.0001
TAD	70.28±8.09	8.10±8.19	0.002
Glucemia	92.16±13.82	93.80±13.77	0.592
HbA1	5.34±0.40	5.82±0.73	0.083
Colesterol total	180.08±38.87	208.60±43.92	0.050
Colesterol LDL	107.49±32.10	114.20±31.92	0.559
Colesterol HDL	54.73±17.21	56.70±20.56	0.884
Triglicéridos	83.75±61.09	176.40±56.72	0.001
<i>Los datos se muestran como media± desviación estándar y significación estadística</i>			

Tabla 14: Cistatina C y factores de riesgo cardiovascular.

Sin embargo, únicamente se encontró **correlación** de los niveles de cistatina C en suero con el IMC, peso y trigliceridemia, es decir, que a mayores niveles de cistatina

C, mayor IMC ($r = 0.279$, $p = 0.03$), peso ($r = 0.273$, $p = 0.033$) y mayores cifras de trigliceridemia ($r = 0.412$, $p = 0.001$). En el caso del resto de los factores estudiados no se encontró correlación.

4.2. Asociación de la cistatina C con el tratamiento con diana cardiovascular

En la tabla 15, se objetiva que aquellos pacientes con niveles superiores de Cistatina C, tomaban en mayor proporción IECAS y estatinas. En el caso de la toma de AAS no se objetivaron diferencias entre ambos grupos.

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
IECAS (n=11)	4 (36.36%)	7 (63.63%)	0.001
AAS (n=24)	19 (79.16%)	5 (20.83%)	0.495
ESTATINAS (n=9)	4 (44.44%)	5 (55.56%)	0.004
<i>Valores mostrados como número y porcentaje y significación estadística</i>			

Tabla 15: Cistatina C y el tratamiento con diana cardiovascular.

4.3. Asociación de la cistatina C con marcadores de inflamación

Al analizar a los pacientes por subgrupos, cistatina normal, <1.01 mg/dl y cistatina C elevada, >1.01 mg/dl, aquellos pacientes con cistatina C elevada eran los que tenían mayores niveles de dímero D y no hubo diferencias significativas en el caso del resto de las variables (Tabla 16).

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
PCR	2.04±4.27	3.06±5.63	0.213
Dímero D	0.75±2.48	0.52±0.26	0.001
Homocisteína	10.51±2.94	17.74±4.87	0.083
Fibrinógeno	339.49±68.97	377.60±73.23	0.115

Los valores se muestran como media ± desviación estándar

Tabla 16: Cistatina C y reactantes de fase aguda.

Sin embargo, se objetivó una correlación entre los niveles séricos de cistatina C y niveles de fibrinógeno y homocisteína, es decir, que a mayores niveles de cistatina C mayores niveles de fibrinógeno y homocisteína. No se obtuvo correlación ni con PCR ni con el dímero D (Tabla 17).

	CISTATINA r	p
PCR	0.190	0.150
Dímero D	0.115	0.426
Homocisteína	0.511	0.001
Fibrinógeno	0.304	0.017
<i>Los datos se muestran como correlación de pearson y significación estadística</i>		

Tabla 17: Correlaciones entre cistatina C y reactantes de fase aguda.

En cuanto a los **factores solubles**, considerados como otros marcadores inflamatorios, se objetivó que los pacientes con concentraciones de cistatina C elevada eran los que presentaban mayores niveles de ET1 (endotelina), y menores de TNF (Tabla 18), manteniendo una diferencia estadísticamente significativa en las **correlaciones**, es decir, a mayores niveles de cistatina C mayores de endotelina ($r=0.501$, $p<0.0001$) y menores de TNF ($r= -0.371$, $p=0.005$).

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
ET1	316.10±1452.62	808.45±1229.54	0.001
IL6	7.30±11.89	4.77±3.32	0.908
IL10	3.09±1.99	42.44±118.65	0.118
TNF	3.33±7.40	0.36±0.59	0.004
INF Gamma	1.93±1.90	4.83±12.45	0.095
<i>Los valores se muestran como media ± desviación estándar y significación estadística</i>			

Tabla 18: Cistatina C y factores solubles.

4.4. Relación de la cistatina C con los nuevos biomarcadores de riesgo cardiovascular: Células progenitoras endoteliales

Se estudiaron las células progenitoras endoteliales como nuevos marcadores cardiovasculares. En la Tabla 19, se detalla el porcentaje y número de células analizadas. Al dividir a los pacientes en los rangos de Cistatina C, no se objetiva ninguna significación estadística.

		Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
CD34	Cel/μl	158.15±122.68	265.34±219.43	0.306
	%	11.26±8.32	12.65±9.7	0.465
CPE	Cel/μl	1.01±1.03	1.69±1.62	0.220
	%	0.70±0.63	0.7±0.49	0.666
C34KDR	Cel/ μl	1.58±1.42	2.42±2.19	0.330
	%	1.12±0.93	1.04±0.79	0.938
CN133KDR	Cel/ μl	0.58±0.56	0.74±0.68	0.520
	%	0.45±0.39	0.35±0.31	0.338

CPE(células progenitoras endoteliales): CD34+CD133+KDR; CK34KDR: CD34+KDR; CN133DKR: CD34+CD133- KDR +

Los valores se muestran como media ± desviación estándar y significación estadística

Tabla 19: Cistatina C y células progenitoras endoteliales.

Sin embargo, cuando se realizan las **correlaciones** entre la concentración de cistatina C y el número de células, se objetivó que a mayores niveles de cistatina C mayores niveles CPE, C34 KDR y CN133 KDR. Contrariamente, si analizamos el porcentaje, únicamente CD 34 se correlacionó con la cistatina C (Tabla 20).

		CISTATINA r	p
CD34	Cel/μl	0.306	0.16
	%	0.279	0.029
CPE	Cel/μl	0.358	0.005
	%	0.153	0.24
C34KDR	Cel/ μl	0.332	0.009
	%	0.079	0.547
CN133KDR	Cel/ μl	0.267	0.038
	%	-0.082	0.532

EPC(células progenitoras endoteliales): CD34+CD133+KDR; CK34KDR: CD34+KDR; CN133DKR: CD34+CD133- KDR +

Los datos se muestran como correlación de pearson y significación estadística

Tabla 20: Correlación entre la cistatina C y CPE.

4.5. Relación de la cistatina C con los factores relacionados con el LES

En cuanto a los **valores analíticos relacionados con el LES**, los pacientes con cistatina C más elevada presentaban un nivel más alto de leucocitos y eritrocitos, pero no en el resto de los parámetros; estos resultados se pueden ver en la tabla 21.

	Cistatina C	Cistatina C	p
	Normal (n= 51)	alterada (n= 10)	
Eritrocitos	1.21±0.41	1.78±0.44	0.001
Leucocitos	4853.92±1692.09	6456.00±2246.73	0.032
Linfocitos	1439.86±426.66	1827.00±755.44	0.092
Plaquetas	220470.59±63697.21	254700±61476.37	0.179
VSG	13.66±11.15	19.44±13.46	0.143

Los valores se muestran como media ± desviación estándar y significación estadística

Tabla 21: Cistatina C y valores analíticos relacionados con el LES.

En la misma línea, se objetivó de una manera estadísticamente significativa, que a mayores concentraciones de cistatina C mayor número de eritrocitos ($r=0.459$, $p=0.001$) y de leucocitos ($r=0.342$, $p=0.007$).

Por otro lado, los pacientes con **daño orgánico**, medido por el valor en la escala SLICC/ACR eran aquellos con mayores niveles de cistatina C, con una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 22). Incluso a mayor concentración de cistatina C, mayor puntuación en la escala SLICC/ACR ($r=0.314$, $p=0.014$). No se objetivó

ninguna diferencia estadísticamente significativa con la actividad de la enfermedad, medida a través de la escala SLEDAI ni tampoco en el caso de los valores de complemento.

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
SLEDAI	1.96±2.42	3.30±2.91	0.150
SLICC/ ACR	1.27±1.17	3.10±2.23	0.011
C3	102.23±27.29	115.33±30.78	0.188
C4	17.00±8.31	18.85±9.96	0.527

Los valores se muestran como media ± desviación estándar y significación estadística

Tabla 22: Cistatina C y factores relacionados con el LES

EL **tipo de afectación de la enfermedad** (cutánea, visceral o mixta) es otro parámetro que no resultó estadísticamente significativo, $p = 0.734$.

Ninguno de los **parámetros de inmunología**, ANA, anti ENA, anti ADN, hipocomplementemia, o la asociación de estos dos últimos, fue estadísticamente significativa, al clasificar a los pacientes con Cistatina C normal o elevada.

En cuanto al **síndrome antifosfolípido**, los datos se respresentan en la tabla 23. Únicamente se objetivó correlación de la cistatina C con el anticoagulante lúpico y al diferenciar ambos grupos por nivel de cistatina, en el grupo de cistatina C alterada, un 30 % de los pacientes presentaban positividad para el mismo, frente al 5.88% en el grupo de cistatina normal, con un número de 51 pacientes ($p=0.046$).

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
Criterios de síndrome antifosfolípido (n=4)	4	0	0.750
Anticoagulante lúpico (n=6)	3	3	0.046
ACAS (n=13)	11	2	0.999
Beta 2GP1 (n=10)	9	1	0.999
<i>Los valores se muestran como valor absoluto y significación</i>			

Tabla 23: Cistatina C y síndrome antifosfolípido

Respecto al **tratamiento con corticoides**, no hubo diferencias en los valores de cistatina entre los que estaban en tratamiento con corticoides, respecto a los que no. La media de cistatina C entre los pacientes que no tomaban corticoides fue de 0.77 ± 0.21 y la de los pacientes que si tenían tratamiento corticoideo fue de 0.85 ± 0.34 , $p=0.32$. Tampoco hubo diferencias entre aquellos pacientes con cistatina C elevada frente a los que la presentaban normal, ($p=0.375$).

Cuando se analizó el **tratamiento con antimaláricos**, no se objetivaron tampoco diferencias. La media de los valores de cistatina entre aquellos pacientes que solo tenían tratamiento con antimaláricos fue de 0.76 ± 0.20 , y la media de los valores de cistatina de aquellos con tratamiento mixto, antimaláricos junto a otro tratamiento más, fue 0.83 ± 0.34 , $p=0.41$. Tampoco hubo diferencias entre aquellos pacientes con cistatina normal o elevada ($p=0.17$).

4.6. Relación entre la cistatina C y la arteriosclerosis subclínica determinada mediante la velocidad onda de pulso y el grosor íntima-media.

En nuestro estudio se tomaron como referencia de medida de factores de arteriosclerosis subclínica, la medida de la velocidad de onda pulso y el grosor íntima media. Los valores medios de las mediciones de ambos parámetros se describen a continuación (Tabla 24). Según las referencias de la sociedad Europea de cardiología (*Boutouyrie, 2010*), que establecen unos valores de referencia en función de la edad y la tensión arterial, nuestras pacientes presentaban mayor rigidez arterial que la correspondida a estos valores [7m/seg (4.5-9.6)]. En cuanto al GIM se tomó como referencia la mediana de nuestros resultados que fue 0.52mm.

FACTORES DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA (n=61)	Valores obtenidos
VOP (m/seg)	7.54±2.14
GIM (mm)	0.25±0.08
<i>Valores mostrados como media ± desviación estándar</i>	

Tabla 24: Factores de arteriosclerosis subclínica

Los resultados muestran que aquellos pacientes con cistatina C elevada, también tenían mayor rigidez (Tabla 25). Además existe una correlación entre los niveles séricos de Cistatina C y la VOP, es decir, que a mayores niveles de cistatina C sérica, mayor aumento de la VOP, que se traduce en mayor rigidez arterial ($r= 0.271$, $p= 0.36$).

	Cistatina C normal (n= 51)	Cistatina C alterada (n= 10)	p
VOP	7.09±1.86	9.82±2.09	< 0.0001
GIM	0.52±0.83	0.52±0.83	0.105

Los valores se muestran como media ± desviación estándar y significación estadística

Tabla 25: Cistatina C y factores de arteriosclerosis subclínica

En el siguiente diagrama (Figura 9), se observa como aquellos pacientes con cistatina C alterada, presentaban mayor velocidad de onda de pulso, y por tanto menor elasticidad arterial.

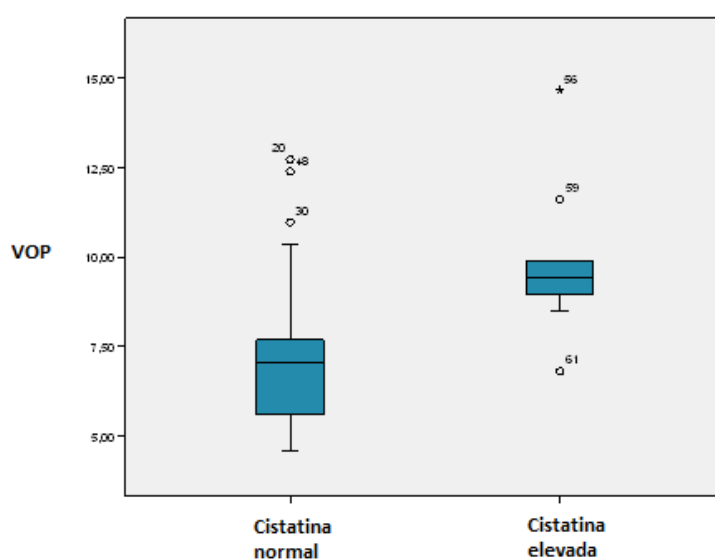


Figura 9: Cistatina C y VOP.

4.7. Análisis de regresión logística

Se tomaron aquellas variables que en análisis univariante hubieran sido significativas y se realizó un modelo estadístico múltiple de regresión back stepwise y se observó que las variables relacionadas de forma independiente con la cistatina C eran el hábito tabáquico ($p=0.029$), la hipertrigliceridemia ($p=0.005$), la homocisteína ($p=0.001$) y el cociente microalbúmina creatinina ($p=0.018$). Estos resultados se muestran en la tabla 26.

	R²0.64 Coeficientes no estandarizados		
VARIABLES	B	Error típico	p
Tabaco	0.122	0.054	0.029
Hipertrigliceridemia	0.224	0.077	0.005
Homocisteína	0.028	0.007	0.0001
Microalbumina/creatinina	0.0001	0.0001	0.018

Tabla 26: Análisis multivariante con variable dependiente Cistatina C

5. CISTATINA C COMO MARCADOR INDEPENDIENTE DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA

El siguiente paso fue realizar un nuevo análisis multivariable, con variable dependiente la VOP, como medidor de la arteriosclerosis subclínica. Las variables incluidas en el análisis fueron aquellas que resultaron estadísticamente significativas en el análisis univariante: HTA, edad, hipertrigliceridemia, homocisteína, microalbúmina/creatinina, SLICC/ACR y cistatina C.

Los resultados muestran que la VOP se relaciona de manera independiente con la edad ($p=0.001$), la HTA ($p=0.001$) y el SLICC/ACR ($p=0.020$). No se relacionó con la cistatina C. Los resultados se muestran en la Tabla 27.

	R² 0.34	Coeficientes no estandarizados		
VARIABLES		B	Error típico	p
HTA		2.164	0.634	0.001
SLICC/ACR		0.401	0.168	0.020
EDAD		2.265	0.598	0.001

Tabla 27: Análisis multivariante con variable dependiente VOP

Teniendo en cuenta la relación de la cistatina C con la microalbuminuria y que no es independiente de la VOP, se realizó **un nuevo análisis** solo con aquellos pacientes que desde el punto de vista renal tenían una situación normal, es decir sin alteración en la TFG, ni tampoco daño estructural medido por la microalbuminuria.

Todos los marcadores de riesgo cardiovascular que previamente habían correlacionado de manera significativa con el nivel de cistatina C, perdían su asociación con ella.

Los resultados expuestos previamente sugieren que la cistatina C no es un factor independiente de riesgo cardiovascular.

DISCUSIÓN

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune asociada a una mayor prevalencia de arterioesclerosis y complicaciones relacionadas comparado con la población general. Los factores de riesgo cardiovascular clásicos son importantes pero no explican por sí solos el aumento de la frecuencia de arteriosclerosis que se objetiva en estos pacientes, siendo incuestionable la implicación de la propia enfermedad así como de sus tratamientos.

En el LES el riñón es un órgano diana frecuentemente afectado. En 1998, the National Kidney Foundation, enfatizó el alto riesgo de enfermedad cardiovascular de los pacientes con enfermedad crónica renal (*Levey, 1998*).

En el contexto de riesgo cardiovascular, la enfermedad renal se define, en síntesis, por una disminución de la tasa de filtrado glomerular o por la presencia de proteinuria como signo precoz de daño renal.

En 2003, *Sarnak*, describe la microalbuminuria como factor independiente de enfermedad cardiovascular en pacientes con DM y no solo por la mayor prevalencia de otros factores de riesgo cardiovascular tradicionales. En el estudio HOPE (*Gerstein, 2001*), la microalbuminuria en pacientes sin DM se asoció a un 61 % de aumento de riesgo de ICTUS, IAM o muerte por enfermedad cardiovascular y en la misma línea, en el estudio PREVEND (*Hillege, 2002*), la presencia de albuminuria se asoció a un 29% de aumento de riesgo de muerte cardiovascular. En el estudio FRAMINGHAM (*Culleton, 2000*), se objetivaron los mismos resultados pero solo en población femenina.

La cistatina C es un inhibidor de proteinasas propuesto como un marcador de función renal mejor que la creatinina, por mantener una secreción constante y no depender del filtrado ni de otros factores, como la masa muscular. Posteriormente, se ha sugerido su papel como posible marcador de riesgo cardiovascular. En 2005, *Shlipak*,

publicó que los pacientes mayores de 65 años y con concentraciones de cistatina C elevadas, con creatinina sérica normal y filtrado glomerular estimado por encima de 60 ml/min/1.73m², a largo plazo, presentaron mayor morbimortalidad cardiovascular que los pacientes con concentraciones de cistatina C dentro del rango de la normalidad, planteándose que la cistatina C puede ser un marcador de enfermedad cardiovascular independiente de su valor como marcador precoz de insuficiencia renal.

Parikh, 2008a, en un estudio con 3241 pacientes, demostró una asociación independiente con los factores como la edad, sexo, IMC, colesterol HDL o tabaco. En la misma línea, otros autores como *Muntner, 2008*, encontraron en un estudio de 4991 adultos, que la prevalencia de dichos factores de riesgo cardiovascular era mayor en individuos con concentración de cistatina C más elevada. Además, la prevalencia de enfermedad coronaria, IAM, angina e ictus correlacionaba con el aumento de la concentración de cistatina C, manteniendo esta relación tras ajustar los valores por factores de riesgo

Pocas publicaciones hacen referencia al papel de la cistatina C en LES (*Chew, 2013; Martinez- Martinez, 2012; Gheita, 2015*) o en otras enfermedades autoinmunes (*Lertnawapan, 2011*) y menos aún, describen el papel de la cistatina C como marcador de riesgo cardiovascular en estos pacientes (*Lertnawapan, 2012; Gustafsson 2012*). Sin embargo, parece lógico investigar si en este grupo de pacientes mantiene su utilidad como medida sensible de la función renal y si además, podría tratarse de un nuevo marcador independiente de arteriosclerosis subclínica.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, se compararon con los datos existentes en la literatura referidos a población general, pacientes con artritis reumatoide (AR) y pacientes con LES.

1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CISTATINA C

La metodología utilizada para el análisis de la cistatina C fue la nefelometría, que es la técnica escogida en la mayoría de los estudios en población general, aunque en algunos otros se analizó mediante ELISA. Los valores de cistatina C considerados como normales por nuestro centro se sitúan entre 0.59-1.01 mg/dl, similares a los presentados en otros estudios. En la cohorte de *Finney, 2000*, hacen una distinción entre pacientes menores o mayores de 50 años, siendo 0.53-0.92 mg/L y 0.58-1.02 mg/L los rangos de normalidad respectivamente. En el estudio Framingham los rangos de normalidad de cistatina C fueron superiores, probablemente por ser pacientes de mayor edad (*Parikh, 2008a*).

El valor medio de cistatina fue 0.80 ± 0.27 mg/dl y el 16.40% de los pacientes de la muestra tenían un valor de cistatina C elevada >1.01 mg/dl. La media del valor de cistatina es similar a la población general (*Garimella, 2015; Arpegard, 2008*) y de los pacientes con LES estudiados en el artículo de *Gustafsson, 2012*, pero menor que en las otras cohortes de pacientes con LES (*Lertnawapan, 2012; Chew, 2013; Gheita, 2015*).

En nuestro estudio, los niveles de cistatina C fueron más bajos por tratarse de población joven y con buen control de la enfermedad.

2. CISTATINA C COMO MARCADOR DE FUNCIÓN RENAL EN PACIENTES CON LES

La mayoría de los pacientes de nuestra muestra no presentan alteración de la función renal ni daño estructural. La media de TFG, medida por ambas fórmulas, MDRD-4 y CKD-EPI, está por encima de 90 ml/min/1.73m² y solo un tercio presentaban una TFG 60-90 ml/min/1.73m². Una quinta parte de los pacientes tenían proteinuria mayor de 30 mg/g.

Como se ha referido previamente, el papel de la cistatina C como marcador de función renal parece probado en la población general (*Dharnidharka, 2002*). Entre sus características fisicoquímicas destaca que se filtra libremente, no se reabsorbe y no se secreta por los túbulos, gracias a lo cual se acercaría al marcador ideal de cálculo de TFG y se considera superior a la creatinina. La creatinina, además de no contar con las propiedades fisiológicas, está influenciada por la masa corporal entre otros. No obstante, en varios artículos se demuestra que los niveles de cistatina C se modifican también por algunos factores como los niveles de PCR, el tabaco, la obesidad, el sexo, la edad, la diabetes y la toma de glucocorticoides, algunos de ellos, presentes en los pacientes con lupus.

En los pacientes con AR, *Lertnawapan, 2011*, en su estudio de 167 pacientes y 91 controles, objetiva una correlación positiva de la concentración de cistatina C con la creatinina y negativa con la TFG medida por la ecuación MDRD. La cistatina C fue significativamente más alta en pacientes con AR que en controles, incluso tras ajustar por TFG.

No existen muchas referencias acerca de la utilidad como marcador de función renal en la población lúpica. *Martínez - Martínez, 2012*, en una breve carta, analiza 60 pacientes con LES observando una correlación positiva con la creatinina. Estos autores concluyen que la cistatina C puede ser un buen marcador de función renal en pacientes con LES, aunque habría que valorar el coste económico de la determinación de la misma. Otros autores como *Lertnawapan, 2012*, en un estudio de 118 pacientes con LES y 83 controles, observan los mismos resultados y también refieren niveles más altos de cistatina C en pacientes con LES que en los controles. También *Chew, 2013*, en su estudio de 178 LES y 68 controles, demuestra una correlación positiva entre la cistatina C y la creatinina, e inversa con la TFG, medida por las ecuaciones de aclaramiento de creatinina y MDRD. Además los pacientes que tenían nefritis lúpica, presentaban niveles más altos de cistatina C que la población general y que los pacientes sin nefritis.

El grupo de *Gheita, 2015*, en su estudio de casos y controles (61 pacientes con LES y 52 sanos), observan que la cistatina C correlacionaba con el grado de afectación renal en la biopsia, según los criterios de la OMS, de tal manera que los pacientes con nefritis lúpica grado V, tenían más elevados los niveles de cistatina C que los de grado I.

El estado inflamatorio puede aumentar las concentraciones séricas de cistatina C, ya que en general, tanto en pacientes con LES como con AR, los niveles son mayores que en controles, lo que podría ser un factor de confusión que dificulta su relación con el daño renal suclínico. No obstante, en los estudios referidos, la actividad de la enfermedad era baja y no se encontró asociación entre ésta y los niveles de cistatina C (*Martínez - Martínez, 2012*).

Recientemente, *Martinez- Martínez, 2013*, estudian las diferentes ecuaciones para la medida de TFG en LES, incluidas fórmulas que incorporan la cistatina C, llegando a la conclusión de que en aquellos pacientes con baja actividad de la enfermedad, baja dosis de corticoides, no fumadores, la mejor ecuación es aquella que tiene en cuenta la cistatina C. Sin embargo, ya que los pacientes con LES con frecuencia no presentan esas características, la ecuación CKD-EPI basada en la creatinina parece la de mayor utilidad.

Nuestros resultados muestran que existe una relación directa entre los niveles de cistatina C y los valores de creatinina e inversa con la tasa de filtrado glomerular, medida ésta por ambas formulas, MDRD y CKD-EPI, además de que aquellos pacientes con valores de cistatina C elevada presentan mayores cifras de creatinina, urea, microalbuminuria y menor TFG por ambas formulas. En nuestra muestra, los valores de cistatina C no se relacionaron con marcadores de actividad de la enfermedad, medida por el SLEDAI, probablemente porque la mayoría de los pacientes se encontraban inactivos en el momento de la determinación.

Nuestros datos y los de la literatura, sugieren que al menos en pacientes con buen control de la actividad lúpica, la cistatina C podría ser utilizada como marcador de función renal subclínica.

3. CISTATINA C Y SU RELACIÓN CON MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, muestran que las pacientes tenían una edad media (45.58 ± 13.13 años) similar a otros trabajos. Presentaban factores de riesgo cardiovascular, como ocurre en otras cohortes, aunque los porcentajes de los mismos son variables. La serie que presentamos, no obstante, al igual que en otros estudios, presenta un riesgo cardiovascular bajo, el HEARTSCORE fue de 1 en el 83.6 % de las pacientes, ya que se trata mayoritariamente de mujeres jóvenes.

Nuestros resultados reflejan que los pacientes con síndrome metabólico, HTA, tabaquismo, hipertrigliceridemia, tenían mayores niveles de cistatina C, y que además, aquellos pacientes con la cistatina C elevada, eran aquellos con mayor IMC, peso, perímetro abdominal, tensión arterial, colesterol total y triglicéridos.

Sin embargo, cuando se realizó el análisis multivariante, solo el tabaco, la hipertrigliceridemia y la presencia de microalbuminuria, resultaron variables independientemente asociadas con la cistatina C.

En la población general, la cistatina C también se ha relacionado con varios factores de riesgo cardiovascular. En el trabajo de *Wu, 2010*, con la edad, género y la presencia de HTA y en el de *Yamashita, 2013* con la edad, circunferencia abdominal, IMC, tensión arterial, triglicéridos y colesterol HDL y LDL.

En pacientes con AR, *Lertnawapan, 2011*, objetivó una correlación de la concentración de cistatina C con la edad, TA y colesterol HDL. Aunque en el análisis multivariante, ajustando los resultados por edad, sexo, raza y score Framingham, solo permanecía significativo el colesterol HDL.

En los pacientes con LES, son pocos los datos al respecto. *Chew, 2012*, encuentra relación del nivel sérico de cistatina C con la edad, triglicéridos, colesterol total y LDL.

Es difícil sacar conclusiones de los trabajos referidos, aunque puede considerarse que tanto en la población general, como en AR y LES, los niveles de cistatina C se correlacionan con algunos factores de riesgo cardiovascular.

Es llamativa la asociación en nuestro estudio de la cistatina C con la **microalbuminuria**, que permanece tras el análisis multivariante. Además, al realizar un subanálisis solo con aquellos pacientes que no presentan microalbuminuria, todas las correlaciones previas de la cistatina C con factores de riesgo cardiovascular se perdieron.

La microalbuminuria, marcador de daño renal subclínico, es un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular. *Barzilay, 2004*, al investigar el papel de la microalbuminuria en la enfermedad coronaria en su estudio de 3312 adultos mayores de 65 años, concluyen que la edad, los marcadores inflamatorios y la HTA se relacionan con la microalbuminuria, independientemente de la presencia de DM o HTA. Además los pacientes con microalbuminuria tenían más enfermedad cardiovascular y coronaria que aquellos sin microalbuminuria.

Otros autores atribuyen a la microalbuminuria un papel como marcador de enfermedad vascular subclínica. *Kramer, 2005*, en un estudio de 6814 adultos entre 45 y 85 años, asocia la microalbuminuria con la calcificación coronaria, sin encontrar relación con el GIM. Otros estudios correlacionan la microalbuminuria con la arteriosclerosis subclínica, medida por el índice tobillo brazo (*Wu, 2010; Garimella,*

2015). La relación con la VOP también se objetiva en varios artículos (*Ishimura, 2007; Ishikawa, 2008*), incluso en pacientes con AR (*Becetti, 2015*).

Existen pocos estudios en los que se analiza la relación de la cistatina C con la microalbuminuria. En población general, *Ix, 2007*, en pacientes con enfermedad coronaria, encuentra asociación entre la cistatina C y eventos cardiovasculares, insuficiencia cardíaca y mortalidad. En este estudio refiere que dos tercios de los pacientes con cistatina C elevada no presentaban microalbuminuria y la cistatina C mantenía su valor predictivo independiente de la microalbuminuria. *Wu, 2010*, demuestra una asociación independiente entre la cistatina C y muerte de causa cardiovascular y no cardiovascular, ajustada por otros factores, que incluyeron la microalbuminuria. *Meng, 2012*, en pacientes con función renal normal, encuentra que la cistatina C, pero no el cociente albúmina/creatinina, fue predictor independiente de eventos cardíacos. En su cohorte, el cociente albúmina/creatinina fue mayor en pacientes con eventos cardiovasculares, al igual que la cistatina C. Contrariamente a lo referido previamente, *Rodondi, 2007*, en su estudio de 523 adultos con un alto porcentaje de pacientes de raza negra en los que se midió el GIM, fue la microalbuminuria pero no la cistatina C, la que se asoció a arteriosclerosis subclínica. Esto se debe a que los niveles de cistatina C en pacientes de raza negra son más bajos, lo que podría explicar, en cierta medida, los resultados y la diferencia con otros estudios.

4. CISTATINA C Y SU RELACIÓN CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN

Como ya hemos visto previamente, es importante conocer el estado inflamatorio de los pacientes en los trabajos que analizan el papel de la cistatina C. Para valorar de una manera indirecta el estado de inflamación en los pacientes de la muestra, se escogieron cuatro parámetros: **PCR, homocisteína, Dímero D y fibrinógeno**.

Las medias de estos valores en las pacientes analizadas se encontraban en el rango de la normalidad, traduciendo la inactividad de la enfermedad de una manera indirecta. Estudiando la relación de estos parámetros con la cistatina C, nuestros datos demuestran que los pacientes con mayor tasa de homocisteína y fibrinógeno son aquellos tienen niveles más elevados de cistatina C y en el análisis multivariante con la cistatina C, la homocisteína se mantuvo como un factor independientemente asociado.

En nuestra cohorte no se encontró relación con la PCR, como marcador de inflamación más fiable, probablemente porque nuestros pacientes presentaban buen control de la enfermedad. Sin embargo, varios estudios en población general correlacionan la cistatina C con la PCR (*Koenig, 2005; Wang, 2008; Taglieri, 2009, Wu, 2010*) y con la homocisteína (*Wang, 2008*), probablemente por ser pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.

En el caso de los pacientes con artritis reumatoide, *Lertnawapan, 2011*, encontró correlación de los niveles de cistatina C con la PCR y el índice de actividad DAS 28 (*Disease Activity Score*), que se mantiene incluso tras ajustar por edad, sexo y raza.

En los pacientes con Lupus, la correlación de cistatina C con la PCR se objetiva en los estudio de *Chew, 2012* y *Lertnawapan, 2012*. En este último también se observa correlación con los niveles de homocisteína.

Es de destacar la relación de la homocisteína y la cistatina C. La homocisteína ya se ha sugerido previamente como factor independiente de arteriosclerosis tanto en población general (*Clarke, 1991*), como en LES (*Petri, 1996*) y también se ha relacionado con parámetros de arteriosclerosis subclínica, como es el caso de la VOP, como medida de elasticidad arterial (*Tso, 2006*). Esta relación podría apoyar el papel de la cistatina C en la arteriosclerosis subclínica.

Dentro de los marcadores inflamatorios, hemos tenido en cuenta varios **factores solubles**. Muchos de estos mediadores están aumentados en pacientes con LES respecto a los controles (*Asanuma, 2006*). Además, algunos de ellos se han asociado con riesgo cardiovascular, ya que en la patogenia de la arteriosclerosis, cuando las células inflamatorias son reclutadas en el endotelio, estas citocinas y otras moléculas de adhesión son mediadoras en el proceso.

En los pacientes de la muestra la cistatina C se correlaciona positivamente con ET1 y de manera inversa con el TNF. Además las pacientes con cistatina C elevada, eran aquellas con mayor concentración de ET1 y menor de TNF. No se correlacionó con los niveles de IL-6, ni con IL-10 ni IFG gamma.

En los pacientes con AR, no se ha descrito correlación con ninguna de las citocinas inflamatorias (*Lertnawapan, 2011*).

En los pacientes con LES, *Lertnawapan, 2012*, objetiva una correlación positiva entre los niveles de cistatina C y los niveles de TNF α e IL6. Los pacientes de su estudio, al igual que en nuestro caso, no presentaban una actividad manifiesta de la enfermedad.

No encontramos una explicación a estos hallazgos diferentes a los nuestros, aunque probablemente sea debido a la variabilidad de estos parámetros en el curso evolutivo.

Parece clara la relación de la cistatina C con los marcadores inflamatorios, especialmente la PCR, en la población general y en pacientes con LES, aunque esto no se vió reflejado en nuestros resultados, quizás por el número insuficiente de pacientes y también por el estado de inactividad de nuestra población.

Respecto a la relación de la cistatina C con los factores solubles, los datos son escasos y poco concluyentes.

5. CISTATINA C Y NUEVOS BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES

En nuestro estudio se analizó el número y porcentaje de células progenitoras endoteliales, que recientemente, se han propuesto como nuevo marcador precoz de lesión vascular. Su papel en la reparación y regeneración endotelial, parece asegurar la integridad cardiovascular (*Jia, 2006*). En este sentido se ha encontrado una disminución en el número y una alteración en sus funciones en la patogénesis de la arteriosclerosis. Existen datos en la literatura que afirman que los pacientes con LES, tienen menos CPE que los individuos sanos, incluso en periodos de inactividad de la enfermedad (*Denny, 2007; Castejon, 2014*), aunque no en todos los estudios el método de cuantificación es homogéneo.

Nuestro trabajo solo muestra una asociación directa de la cistatina C con el porcentaje de células CD34, aunque al tener en cuenta el número absoluto, las correlaciones de la cistatina se ampliaron y se objetivó que a mayor concentración de cistatina C, mayor número de células progenitoras y mayor número de células CD34+KDR+.

Es difícil interpretar estos hallazgos ya que tanto el descenso de las células progenitoras endoteliales como el aumento de cistatina C se ha relacionado con los factores de riesgo vascular y el SLICC/ACR. Quizás, la complejidad de factores que intervienen en la reparación del daño vascular en pacientes con LES y el desconocimiento de la dinámica de los progenitores endoteliales, explique esta disparidad.

No existen datos en la literatura en los que se correlacionen el número de células progenitoras endoteliales con la cistatina C.

6. CISTATINA C Y SU RELACIÓN CON MARCADORES DE LES

El tiempo medio de evolución de enfermedad fue de 13 años, similar a la de otros trabajos de pacientes con LES (*Selzer, 2001; Tso, 2005; Shang, 2008; Lertnawapan, 2012; Gustafsson, 2012; Chew, 2013*). Los pacientes de la muestra, al igual que en otras series como la de *Lertnawapan, 2012; Martínez-Martínez, 2012 o Gheita, 2015*, presentaban poca actividad de la enfermedad y escaso daño orgánico. El porcentaje de enfermos con SLEDA ≤ 4 fue de un 82% y presentaron un SLICC/ACR=0, el 29.5 %. Otras cohortes representan pacientes en diferente estado. En el estudio de *Gustafsson, 2012*, el 59% de los pacientes tenían un SLICC/ACR >1 y el 59% además un índice de actividad SLAM >6 .

En nuestro estudio, se objetivó una relación directa entre el índice de daño orgánico SLICC/ACR y los niveles de cistatina C. Sin embargo, el análisis multivariante no pudo demostrar esta relación independiente. No se encontró relación de los niveles de cistatina C con la actividad de la enfermedad, medida por el SLEDAI, probablemente porque la mayoría de nuestros pacientes presentaban un índice bajo, traduciendo inactividad de la misma. No se objetivó correlación con otros parámetros de actividad serológica como las cifras de complemento o la presencia de anticuerpos antiADN. Sin embargo, se observó una correlación entre la cistatina C y la presencia de anticoagulante lúpico, dato que no está referido en la literatura.

Estos datos son similares a los que aporta *Lertnawapan, 2012*, cuya población tiene características semejantes a la nuestra respecto al estado de la actividad de la enfermedad. *Gheita, 2015*, también objetiva una correlación entre la cistatina C y SLICC/ACR. En el estudio de *Martínez – Martínez, 2012*, no encuentran tampoco asociación con el MEX- SLEDAI (cohorte mexicana), pero no analizan la escala de

daño orgánico. *Chew, 2012*, objetiva correlación con ambas escalas, SLEDAI 2K y SDI, pero este estudio no puntualiza el grado de actividad de la enfermedad de sus pacientes.

Nuestros datos son similares a lo descrito en la literatura. Las pacientes de nuestra serie presentan buen control de la enfermedad, que puede justificar la ausencia de correlación con el índice SLEDAI. Su relación con el SLICC/ACR es esperable ya que este índice es un marcador más fiable de daño cardiovascular y se correlaciona con marcadores de arteriosclerosis subclínica, como la presencia de placa carotídea (*Roman, 2003*), el aumento de la GIM (*Manzi, 1999*) y también el aumento de la VOP (*Selzer, 2001; Sabio, 2009; Valero-Gonzalez, 2014*).

El tratamiento al que fueron sometidos los pacientes de nuestro estudio fue el habitual, siendo los antimaláricos la base en la mayoría, solos o combinados con inmunosupresores. En nuestra población, no se observó relación de los niveles séricos de cistatina C con la toma de corticoides, probablemente porque la dosis que estaban tomando las pacientes de la muestra era muy baja. Estos mismos resultados fueron observados en el trabajo de *Martínez-Martínez, 2012*. Sin embargo, *Lertnawapan, 2012*, concluye que sí existe una relación entre la toma de corticoides y los niveles séricos de cistatina C. Respecto a la relación de la cistatina C con el tratamiento con antimaláricos, nuestros resultados muestran que no existe asociación. Estos datos son similares a los de otras series de pacientes con LES (*Lertnawapan, 2012; Martínez-Martínez, 2012*).

7. CISTATINA C Y ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA

Para el estudio de la arteriosclerosis subclínica existen diferentes procedimientos de medida que varían en cuanto a la sensibilidad, complejidad y reproductibilidad de la técnica. El índice tobillo brazo, ecografía doppler para estudio de placa carotídea, TC para la visualización de calcio en las arterias coronarias, estudios de perfusión miocárdica por SPECT y finalmente la determinación a través de ecografía doppler del GIM y la VOP, que son los parámetros elegidos en nuestro estudio.

La formación de la placa de ateroma es un proceso dinámico y secuencial que comienza con la disfunción endotelial y aumento de rigidez arterial medida por la VOP, se sigue de aumento de grosor íntima media y finalmente, por la formación de placas arteriales visualizadas por ECO (*Tziomalos, 2008; Zardi, 2010*). Todo este proceso precede a la aparición de los eventos clínicos. Nosotros elegimos en nuestro estudio la medición de la VOP, por su sensibilidad al detectar daño vascular en fases precoces, reproductibilidad y por considerarse la prueba *gold standard* (*Tso, 2005*).

La VOP media en nuestra muestra fue de $7.54\text{m/s} \pm 2.14$. Basándonos en los estándares de normalidad de la población general publicados por la Sociedad Europea de Cardiología (*Boutouyrie, 2010*), nuestros pacientes presentan mayor rigidez arterial que la correspondiente a su edad y TA.

Los resultados de nuestro estudio muestran que a mayores niveles de cistatina C mayor VOP y que los pacientes con cistatina C alterada tenían también más rigidez arterial. Sin embargo, en el análisis multivariante con la cistatina C, no se objetivó la VOP como un factor relacionado de manera independiente con la cistatina C.

Se realizó también la medida de la GIM en muchas de nuestras pacientes, pero los resultados obtenidos no mostraron una asociación entre los niveles séricos de cistatina C y el GIM.

En 2009, *Madero* en su estudio de población general, analiza la medida de la VOP en pacientes ancianos con enfermedad renal crónica y estudia además de la creatinina y del filtrado glomerular, el valor de la cistatina C, encontrando que los pacientes con mayor cistatina C eran aquellos con mayor VOP y por tanto mayor rigidez arterial. Es conocida en la literatura la relación entre la afectación renal y la VOP, pero en el estudio que mencionamos, solo se encontró relación entre los niveles séricos de cistatina C y la VOP, por lo que sugiere que dicho parámetro es un posible marcador de riesgo cardiovascular.

La relación del GIM con la cistatina C se estudia en pocos artículos. *Yamashita, 2013* y *Rodondi, 2007*, no encuentran asociación entre los niveles séricos de cistatina C y el GIM, sin embargo, *Monteiro, 2012*, si encuentra relación pero sus resultados, no permiten concluir que la asociación entre la cistatina C y el GIM, se pueda considerar independiente de la función renal.

No hay trabajos publicados en este sentido en pacientes con enfermedades inflamatorias ni LES.

Existen múltiples estudios, tanto en la población general, como en pacientes con LES, o pacientes con AR, en los que intentan relacionar los niveles de cistatina C con otras técnicas de arteriosclerosis subclínica.

Respecto al índice tobillo brazo, en el trabajo de *Urbonaviciene, 2011*, en el que se estudian 378 pacientes con enfermedad arterial periférica, no encuentran correlación entre los niveles de dicho índice y los valores de cistatina C. Sin embargo, *Yamashita,*

2013, en un estudio de 637 pacientes adultos, hay una correlación entre la cistatina C y el índice tobillo-brazo aunque solo en mujeres. Estos autores no encuentran relación con la GIM, y explican sus resultados por ser el índice tobillo-brazo una técnica de mejor sensibilidad y precocidad. Referente a la diferencias entre géneros, en su estudio, la tasa de fumadores era mayor en hombres (23% vs 3% en mujeres), lo que podría haber influenciado en los valores de cistatina C.

La medida del calcio coronario, a través de TAC, y su relación con cistatina en población general, fue estudiada por *Parikh, 2008b* e *Ix, 2008*, encontrando correlación en el análisis univariante, pero no se pudo demostrar en el multivariante.

En los pacientes de *Lertnawapan, 2011*, con AR en los que se midió el score Agatston de calcio arterial coronario por TC, se objetivó una correlación con la cistatina C, en el análisis univariante, pero nuevamente se pierde la correlación cuando se ajusta por edad, raza, género y score de Framingham.

En el trabajo de *Lertnawapan, 2012*, estudian pacientes con LES sin encontrar en un análisis multivariante, relación entre la cistatina C y calcio coronario medido por TC.

Nuestros datos y los de los trabajos referidos, sugieren que hay una relación entre la cistatina C y la arteriosclerosis subclínica, cuando se utilizan procedimientos capaces de detectar la lesión vascular en sus fases más precoces como es la medida de la VOP.

8. CISTATINA C COMO MARCADOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR INDEPENDIENTE EN PACIENTES CON LES

Después de lo expuesto previamente por nuestros datos y por las publicaciones al respecto, cabría suponer que la cistatina C fuese un buen marcador de riesgo cardiovascular precoz en pacientes con LES. No obstante la complejidad de los pacientes con LES y la dificultad de desligar el papel de la función renal, la actividad de la enfermedad y su tratamiento con los niveles de cistatina C, hacen difícil sacar conclusiones al respecto.

Con objeto de analizar si la cistatina C es un factor independiente de arteriosclerosis subclínica, realizamos en nuestro estudio un segundo análisis multivariante, tomando como variable dependiente la VOP, ya que es el marcador sensible y precoz de daño vascular usado en nuestro estudio. Nuestros resultados mostraron que solo la HTA, la edad y el SLICC/ACR son factores que se asocian de manera independiente con la VOP y no la cistatina C. Estos resultados no son sorprendentes ya que la edad y la tensión arterial, son factores determinantes en la rigidez arterial (*Boutouyrie, 2010*) y la relación con el SLICC/ACR ha sido publicado por nuestro grupo previamente (*Valero-Gonzalez, 2014*). Se concluye que la cistatina C en nuestros pacientes no fue un marcador independiente de arteriosclerosis subclínica.

Respecto a las referencias en la literatura de la cistatina C como marcador de enfermedad vascular establecida, los primeros artículos en la población general no consiguen desligarla de la relación que guarda con el FG (*Shlipak, 2005; Maahs 2007; Wang 2008; Astor, 2012*), incluso en pacientes con mínima afectación del filtrado glomerular (*Taglieri, 2009*).

Otros estudios concluyen que la cistatina C podría ser un marcador de riesgo cardiovascular independiente de la función renal. *Koenig, 2005*, propone a la cistatina como marcador pronóstico entre los pacientes con enfermedad coronaria crónica, en relación al riesgo de un segundo evento cardíaco. En este estudio ni la creatinina, ni el aclaramiento de creatinina se asociaron con nuevos eventos, mientras que sí lo hizo, de manera significativa, la cistatina C, incluso tras ajustar con otros factores clásicos. Concluyen por ello, que la cistatina C podría tener un importante valor pronóstico en los pacientes con enfermedad cardíaca isquémica. *Hoke, 2010*, en un estudio con seguimiento prolongado, relaciona a la cistatina C con el riesgo de eventos en pacientes con arteriosclerosis asintomática, y refiere que aquellas personas con mayores niveles séricos de cistatina C, tienen mayor riesgo de un primer evento cardíaco. Estos autores no encuentran relación con la creatinina, aunque sí con el MDRD, pero solo en el caso de un descenso muy importante. *Arpegård, 2008*, concluye que los pacientes con mayor nivel de cistatina C eran aquellos con enfermedad arterial periférica más grave y en este subgrupo, *Urbonaviciane, 2011*, relaciona los niveles de cistatina C con mayor riesgo de muerte cardiovascular.

Todos estos artículos concluyen que la cistatina C es un biomarcador independiente de riesgo cardiovascular, sin embargo, solo tienen en cuenta medidas de función renal y no tienen en cuenta otros parámetros como la microalbuminuria.

En la población con LES, los estudios existentes son muy escasos, tan solo dos hacen referencia al papel de la cistatina C como marcador de riesgo cardiovascular independiente, pero de la misma manera, solo se tiene en cuenta la medida de la función renal a través de la creatinina o del filtrado glomerular, pero ninguno menciona la microalbuminuria. *Gustafsson, 2012*, en su estudio de 208 pacientes lúpicos para investigar marcadores de riesgo de mortalidad cardiovascular, concluye que la cistatina

C fue predictor de mortalidad cardiovascular y por otras causas. El otro estudio dirigido por *Letnawapan, 2012*, de 118 pacientes y 83 controles, refiere que la cistatina C se asoció con marcadores inflamatorios pero no con arteriosclerosis coronaria.

De todos estos resultados, se deduce que el papel de la cistatina C en población general como marcador de función renal está claro y es superior al de la creatinina. En pacientes con LES, muchos son los factores de confusión que pueden alterar sus valores, como la propia enfermedad o el tratamiento con corticoides, pero en nuestra cohorte, con buen control de la enfermedad, sin signos de actividad, es un marcador de disfunción renal subclínica.

Respecto a su papel como marcador de riesgo cardiovascular, los resultados son muy contradictorios. En la población general, la mayoría de los autores atribuyen al deterioro de la función renal el papel patogénico en la lesión vascular. Sin embargo, otros se refieren a la cistatina C como marcador independiente de arteriosclerosis. En nuestro trabajo, el nivel sérico de cistatina C no fue un parámetro independiente de arteriosclerosis subclínica, probablemente por su asociación con la microalbuminuria..

Las limitaciones de nuestro trabajo, pacientes con enfermedad inflamatoria crónica, en tratamiento con corticoides y el número de pacientes, pueden haber influido en nuestros resultados.

CONCLUSIONES

- 1- En nuestra población de pacientes con lupus eritematoso sistémico, con buen control de la actividad inflamatoria, la cistatina C es un marcador de función renal.
- 2- El nivel sérico de cistatina C se asoció de manera independiente con la microalbuminuria en la muestra estudiada, sugiriendo su valor como marcador de daño renal subclínico.
- 3- La concentración de cistatina C se correlacionó con factores de riesgo cardiovascular clásicos, con marcadores inflamatorios, como la homocisteína, con factores lúpicos, como el SLICC/ACR y con factores de arteriosclerosis subclínica, como la velocidad onda-pulso. No se encontró correlación con la subpoblación de células progenitoras endoteliales estudiadas. En el análisis multivariante, solo la presencia de homocisteína, microalbuminuria, hipertrigliceridemia y hábito tabáquico mantuvieron su asociación de manera independiente.
- 4- La cistatina C no es un marcador de riesgo cardiovascular en nuestra población de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Solo la hipertensión arterial, la edad y el SLICC/ACR se identificaron como factores independientes de arteriosclerosis subclínica, medida por velocidad onda-pulso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *The Journal of Rheumatology* 1995; 22: 1259-64.
- Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall A, Jensson O, Grubb A. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochemical Journal* 1990; 268: 287– 94.
- Arpegård J, Ostergren J, de Faire U, Hansson LO, Svensson P. Cystatin C- a marker of peripheral atherosclerotic disease? *Atherosclerosis* 2008; 199: 397-401.
- Asanuma Y, Oeser A, Shintani A, Turner E, Olsen N, Fazio S, Linton MF, Raggi P, Stein CM. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2407-15.
- Asanuma Y, Chung C, Oeser A, Shintani A, Stanley E, Raggi P, Stein CM. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33: 539-45.
- Astor BC, Shafi T, Hoogeveen RC, Matsushita K, Ballantyne CM, Inker LA, Coresh J. Novel markers of kidney function as predictors of ESRD, cardiovascular disease, and mortality in the general population. *American Journal of Kidney Diseases* 2012; 59: 653-62.
- Babay Z, Al-Wakeel J, Addar M, Mittwalli A, Tariff N, Hammad D, Ali N, Al-Askar A, Choudhary AR. Serum cystatin C in pregnant women: reference values, reliable and superior diagnostic accuracy. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology* 2005; 32:175-9.
- Barzilay JI, Peterson D, Cushman M, Cushman M, Heckbert SR, Cao JJ, Blaum C, Tracy RP, Klein R, Herrington DM. The relationship of cardiovascular risk factors to microalbuminuria in older adults with or without diabetes mellitus or hypertension: the Cardiovascular Health Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2004; 44: 25-34.
- Becetti K, Oeser A, Ormseth MJ, Solus JF, Raggi P, Stein CM, Chung CP. Urinary albumin excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and associated with arterial stiffness. *The Journal of Rheumatology* 2015; 42: 593-8.
- Bell M, Granath F, Martensson J, Löfberg E, Ekblom A, Martling CR. Cystatin C is correlated with mortality in patients with and without acute kidney injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2009; 24: 3096-102.
- Bernatsky S, Boivin J.-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman D, Urowitz M, Fortin PR, Petri M, Barr S, Gordon C, Bae SC, Isenberg D, Zoma A, Aranow C, Dooley MA, Nived O, Sturfelt G, Steinsson K, Alarcón G, Senécal JL, Zummer M, Hanly J, Ensworth S, Pope J, Edworthy S, Rahman A, Sibley J, El- Gabalawy H, McCarthy T, St Pierre Y, Clarke A, Ramsey-Goldman R. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 54: 2550-7.

- Bjarnadóttir M, Grubb A, Olafsson I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1995; 55: 617–23.
- Bjarnegråd N, Bengtsson C, Brodzki J, Sturfelt G, Nived O, Länne T. Increased aortic pulse wave velocity in middle aged women with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006; 15: 644-50.
- Bökenkamp A, van Wijk JA, Lentze MJ, Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations. *Clinical Chemistry* 2002; 48:1123-6.
- Boutouyrie P. The references values for arterial stiffness collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: “establishing normal and references values”. *European Heart Journal* 2010; 31: 2338-50.
- Bóyum AJ. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1968; 21: 77-89.
- Bruce IN, Burns R, Gladman D, Urowitz M. Single photon emission computed tomography dual isotope myocardial perfusion imaging in women with systemic lupus erythematosus. I. Prevalence and distribution of abnormalities. *The Journal of Rheumatology* 2000; 27: 2372-7.
- Bruce IN, Urowitz M, Gladman D, Ibañez D, Steiner G. Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48: 3159-67.
- Bulkley BH, Roberts W. The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. *The American Journal of Medicine* 1975; 58: 243-64.
- Cacciapaglia F, Zardi EM, Coppolino G, Buzzulini F, Margiotta D, Arcarese L, Vadacca M, Amoroso A, Afeltra A. Stiffness parameters, intima-media thickness and early atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2009; 18: 249-56.
- Castejon R, Jimenez-Ortiz C, Valero-Gonzalez S, Rosado S, Mellor S, Yebra-Bango M. Decreased circulating endothelial progenitor cells as an risk factor of subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2014; 53: 631-8.
- Chew C, Pemberton PW, Husain AA, Haque S, Bruce IN. Serum cystatin C is independently associated with renal impairment and high sensitivity C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental of Rheumatology* 2013; 31: 251-5.

- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *The New England Journal of Medicine* 1991; 324: 1149-55.
- Clausen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1961; 107: 170-2.
- Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney injury 2012. http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/AKI.PHP.
- Colombo BM, Murdaca G, Caiti M, Rodriguez G, Grassia L, Rossi E, Indiveri F, Puppo F. Intima-media Thickness: a marker of accelerated atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Annals of the New Yorker Academy of Sciences* 2007; 1108:121-6.
- Culleton BF, Larson MG, Parfrey PS, Kannel WB, Levy D. Proteinuria as a risk factor for cardiovascular disease and mortality in older people: a prospective study. *The American Journal of Medicine* 2000; 109: 1-8.
- De Boer IH, Katz R, Cao JJ, Fried LF, Kestenbaum B, Mukamal K, Rifkin DE, Sarnak MJ, Shlipak MG, Siscovick DS. Cystatin C, albuminuria and mortality among older adults with diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1833-8.
- Delanaye P, Cavalier E, Radermecker RP, Paquot N, Depas G, Chapelle JP, Scheen AJ, Krzesinski JM. Cystatin C or creatinine for detection of stage 3 chronic kidney disease in anorexia nervosa. *Nephron Clinical Practice* 2008; 110: 158-63.
- De Leeuw K, Smit A, De Groot E, Van Roon A, Kallenberg C, Bijl M. Longitudinal study on premature atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Atherosclerosis* 2009; 206: 546-50.
- Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, McCune WJ, Kaplan MJ. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood* 2007; 110: 2907-15.
- Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases* 2002; 40: 221-6.
- El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, Bernstein RM, Bruce INN. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation* 2004; 110: 399-404.
- Esdaile J, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, Du Berger R, Côte R, Grover SA, Fortin PR, Clarke AE, Sénécal JL. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2001; 44: 2331-7.

- Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR- history, indications, and future research. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 1-8.
- Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Annals of Clinical Biochemistry* 2000; 37: 49-59.
- Fricker M, Wiesli P, Brändle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney International* 2003; 63:1944-7.
- Galteau MM, Guyon M, Gueguen R, Siest G. Determination of serum cystatin C: Biological variation and reference values. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2001; 39: 850-7.
- Garimella PS, Ix JH, Katz R, Shlipak MG, Criqui MH, Siscovick DS, Kramer H, Sibley CT, Sarnak MJ. Association of albumin-creatinine ratio and cystatin c with chang in ankle- braquial index: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *American Journal of Kidney Diseases* 2005; 65: 33-40.
- Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Hallé JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S; HOPE Study Investigators. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death and heart failure in diabetic and non diabetic individuals. *JAMA* 2001; 286: 421-6.
- Gheita TA, Abd El Baky AM, Assal HS, Farid TM, Rasheed IA, Thabet EH. Serum cystatin C, urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in juvenile and adult patients with systemic lupus erythematosus: Correlation with clinical manifestations, disease activity and damage. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 2015; 26: 497-506.
- Gladman DD, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American college of rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39: 363-9.
- Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Säemann M, Schwarzingler I, Buranyi B, Steiner G, Smolen JS. Endothelial progenitor cells in active rheumatoid arthritis: effects of tumour necrosis factor and glucocorticoid therapy. *Annals of Rheumatic Diseases* 2007; 66: 1284-8.
- Grubb A, Lffberg H. Human g-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 1982; 79: 3024-7.
- Grubb AO. Cystatin C Properties and use as diagnostic marker. *Advances in Clinical Chemistry* 2001; 35: 63-98.

- Gustafsson JT, Simard JF, Gunnarsson I, Elvin K, Lundberg IE, Hansson LO, Larsson A, Svenungsson E. Risk factors for cardiovascular mortality in patients with systemic lupus erythematosus, a prospective cohort study. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14: R46.
- Haider YS, Roberts WC. Coronary arterial disease in systemic lupus erythematosus; quantification of degrees of narrowing in 22 necropsy patients (21 women) aged 16 to 37 years. *The American Journal of Medicine* 1981; 70: 775-81.
- Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney International* 2004; 66:1115-22.
- Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE;Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and nocardiovascular mortality in general population. *Circulation* 2002; 106: 1777-82.
- Hoke M, Amighi J, Mlekusch W, Schlager O, Exner M, Sabeti S, Dick P, Koppensteiner R, Minar E, Rumpold H, Wagner O, Schillinger M. Cystatin C and the risk for cardiovascular events in patients with asymptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke* 2010; 41: 674-9.
- Ishikawa T, Hashimoto J, Morito RH, Hanazawa T, Aikawa T, Hara A, Shintani Y, Metoki H, Inoue R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Totsune K, Hoshi H, Satoh H, Imai Y. Association of microalbuminuria with brachial-ankle pulse wave velocity: the Ohasama Study. *American Journal of Hypertension* 2008; 21: 413-8.
- Ishimura E, Taniwaki H, Tsuchida T, Obatake N, Emoto M, Shoji T, Shioi A, Inaba M, Nishizawa Y. Urinary albumin excretion associated with arterial wall stiffness rather than thickness in type 2 diabetic patients. *Journal of Nephrology* 2007; 20: 204-11.
- Ix JH, Shlipak MG, Chertow GM, Whooley MA. Association of cystatin C with mortality, cardiovascular events, and incident heart failure among persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Circulation* 2007; 116:115: 173-9.
- Ix JH, Katz R, Kestenbaum B, Fried LF, Kramer H, Stehman-Breen C, Shlipak MG. Association of mild to moderate kidney dysfunction and coronary calcification. *Journal of the American Society of Nephrology* 2008; 19: 579-85.
- Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H Ikeda U. Therapeutic potencial of endotelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* 2006; 4: 59-65.
- Jiménez C, Marco V. Doppler velocity analysis in occlusion and normal carotid arteries. *Cerebrovascular diseases* 2003; 16 Suppl 2: 21.

- Karp I, Abrahamowicz M, Fortin P, Pilote L, Neville C, Pineau C, Esdaile JM. Recent corticosteroid use and recent disease activity: independent determinants of coronary heart disease risk factors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2008; 59: 169-75.
- Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005; 64B: 1-8.
- Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, Hillege HL, De Zeeuw D, Curhan GC, De Jong PE. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney International* 2004; 65: 1416-21.
- Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 321-7.
- Köttgen A, Selvin E, Stevens LA, Levey AS, Van Lente F, Coresh J. Serum cystatin C in the United States: The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *American Journal of Kidney Disease* 2008; 51: 385-94.
- Kramer H, Jacobs DR, Bild D, Post W, Saad MF, Detrano R, Tracy R, Cooper R, Liu Kiang. Urine albumin excretion and subclinical cardiovascular disease: The multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Hypertension* 2005; 46: 28-43.
- Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk P, Ciolkiewicz M, Sierakowski S. Clinical significance of selected endothelial activation markers in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35: 1307-13.
- Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* 2003; 34: 1203-6.
- Lertnawapan R, Bian A, Rho YH, Kawai VK, Raggi P, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Cystatin C, renal function, and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2011; 38: 2297-300.
- Lertnawapan R, Bian A, Rho YH, Raggi P, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Cystatin C is associated with inflammation but not atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012; 21: 279-87.
- Levey A.S, Beto JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, Klag MJ, Mailloux LU, Manske CL, Meyer KB, Parfrey PS, Pfeffer MA, Wenger NK, Wilson PW, Wright Jr JT. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *American Journal of Kidney Diseases* 1998; 32: 853-906.

- Lima DS, Sato EI, Lima VC, Miranda F Jr, Hatta FH. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2002; 29: 292-7.
- Li X, Liu Z, Cheng Z, Cheng X. Cysteinyl cathepsins: multifunctional enzymes in cardiovascular disease. *Chonnam Medical Journal* 2012; 48: 77-85.
- Maahs DM, Ogden LG, Kretowski A, Snell-Bergeon JK, Kinney GL, Berl T, Rewers M. Serum cystatin C predicts progression of subclinical coronary atherosclerosis in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2774-9.
- Madero M, Wassel CL, Peralta CA, Najjar SS, Sutton-Tyrrell K, Fried L, Canada R, Newman A, Shlipak MG, Sarnak MJ; Health ABC Study. Cystatin C associates with arterial stiffness in older adults. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20:1086-93.
- Magder LS, Petri M. Incidence of and risk factors for adverse cardiovascular events among patients with systemic lupus erythematosus. *American Journal of Epidemiology* 2012; 176: 708-19.
- Maksimowicz-McKinnon K, Magder L, Petri M. Predictors of carotid atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33: 2458-63.
- Manger K, Kusus M, Forster C, Ropers D, Daniel WG, Kalden JR, Achenbach S, Manger B. Factors associated with coronary artery calcification in young female patients with SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003; 62: 846-50.
- Manzi S, Meilahn E, Rairie J, Conte C, Medsger T Jr, Jansen-McWilliams L, D'Agostino RB, Kuller LH. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with Framingham study. *American Journal of Epidemiology* 1997; 145: 408-15.
- Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, Kuller LH. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42: 51-60.
- Martínez-Martínez MU, Abud-Mendoza C. Serum cystatin C as a marker of renal function in patients with systemic lupus erythematosus. *Reumatología Clínica* 2012; 8: 158-9.
- Martínez-Martínez MU, Mandeville P, Llamazares-Azuara L, Abud-Mendoza C. CKD-EPI is the most reliable equation to estimate renal function in patients with systemic lupus erythematosus. *Nefrología* 2013; 33: 99-106.
- Meng L, Yang Y, Qi LT, Wang XJ, Xu GB, Zhang BW. Elevated serum cystatin C is an independent predictor of cardiovascular events in people with relatively normal renal function. *Journal of Nephrology* 2012; 25: 426-30.

- Monteiro Junior Fd, Ferreira PA, Nunes JA, Cunha Júnior CP, Brito RL, Costa JH, Lima JR, Lages JS, Salgado Filho N, Lima VC. Correlation between serum cystatin C and markers of subclinical atherosclerosis in hypertensive patients. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2012 ; 99: 899-906.
- Moonen JR, de Leeuw K, van Seijen XJ, Kallenberg CG, van Luyn MJ, Bijl M, Harmsen MC. Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9: R84.
- Muntner P, Mann D, Winston J, Bansilal S, Farkouh ME. Serum cystatin C and increased coronary heart disease prevalence in US adults without chronic kidney disease. *American Journal of Cardiology* 2008; 102: 54-7.
- Mussap M, Dalla Vestra M, Fioretto P, Saller A, Vanagnolo M, Nosadini R, Plebani M. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney International* 2002; 61:1453-61.
- Newman JD. Cystatin C. *Annals of Clinical Biochemistry* 2002; 39: 89-104.
- Nikpour M, Gladman DD, Ibañez D, Bruce IN, Burns RJ, Urowitz MB. Myocardial perfusion imaging in assessing risk of coronary events in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36: 288-94.
- Odden MC, Scherzer R, Bacchetti P, Szczech LA, Sidney S, Grunfeld C, Shlipak MG. Cystatin C level as a marker of kidney function in human immunodeficiency virus infection. *Archives of Internal Medicine* 2007; 167: 2213-9.
- O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340: 14-22.
- Orlando R, Mussap M, Plebani M, Piccoli P, De Martin S, Floreani M, Padrini R, Palatini P. Diagnostic value of plasma cystatin C as a glomerular filtration marker in descompensated liver cirrhosis. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 850-8.
- Papamichael CM, Lekakis JP, Stamatelopoulos KS, Papaioannou TG, Alevizaki MK, Cimponeriu AT, Kanakakis JE, Papapanagiotou A, Kalofoutis AT, Stamatelopoulos SF. Ankle-brachial index as a predictor of the extent of coronary atherosclerosis and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *American Journal of Cardiology* 2000; 86: 615-8.
- Parikh NI, Hwang SJ, Yang Q, Larson MG, Guo CY, Robins SJ, Sutherland P, Benjamin EJ, Levy D, Fox CS. Clinical correlates and heritability of cystatin C (from the Framingham Offspring Study). *The American Journal of Cardiology* 2008a; 102: 1194-8.
- Parikh NI, Hwang SJ, Larson MG, Hoffmann U, Levy D, Meigs JB, O'Donnell CJ, Fox CS. Indexes of kidney function and coronary artery and abdominal aortic

calcium (from the Framingham Offspring Study). *The American Journal of Cardiology* 2008b; 102: 440-3.

- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, OZ MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-8.
- Petri M, Spence D, Bone L, Hochberg M. Coronary artery disease risk factors in the Johns Hopkins lupus cohort: prevalence, recognition by patients and preventive practices. *The American Journal of Medicine* 1992a; 71: 291-302.
- Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg M. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Medicine* 1992 b; 93: 513-9.
- Petri M, Roubenoff R, Dallal G, Nadeau M, Selhub J, Rosenberg I. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1996; 348: 1120-4.
- Pöge U, Gerhardt T, Bökenkamp A, Stoffel-Wagner B, Klehr HU, Sauerbruch T, Woitas RP. Time course of low molecular weight proteins in the early kidney transplantation period--influence of corticosteroids. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2004; 19: 2858-63.
- Poredos P. Intima-media thickness: indicator of cardiovascular risk and measure of the extent of atherosclerosis. *Vascular Medicine* 2004; 9: 46-54.
- Randers E, Erlandsen E. Serum Cystatin C as an Endogenous Marker of the Renal Function – a Review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1999; 37: 389-95.
- Rawlings ND, Baret AJ. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 1990; 30: 60-71.
- Reynolds HR, Buyon J, Kim M, Rivera TL, Izmirly P, Tunick P, Clancy RM. Association of plasma soluble E-selectin and adiponectin with carotid plaque in patients with systemic lupus erythematosus. *Atherosclerosis* 2010; 210: 569- 74.
- Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2008; 35: 1789-94.
- Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renaltransplant patients. *Clinical Chemistry* 2001; 47:2055–9.
- Robak E, Kierstan M, Cebula B, Krawczynska A, Sysa-Jedrzejowska A, Wierzbowska A, Smolewski P, Robak T. Circulating endothelial cells and

angiogenic proteins in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; 18: 332-41.

- Rodondi N, Yerly P, Gabriel A, Riesen WF, Burnier M, Paccaud F, Bovet P. Microalbuminuria, but not cystatin C, is associated with carotid atherosclerosis in middle-aged adults. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2007; 22: 1107-14.
- Roman M, Shanker B-A, Davis A, Lockshin M, Sammaritano L, Simantov R, Crow MK, Schwartz JE, Paget SA, Devereux RB, Salmon JE. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2339-406.
- Roman M, Crow M, Lockshin M, Devereux R, Paget S, Sammaritano L, Levine DM, Davis A, Salmon JE. Rate and determinants of progression of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56: 3412-9.
- Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340: 115-26.
- Rubin LA, Urowitz MB, Gladman DD. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. *The Quarterly Journal of Medicine* 1985; 55: 87-98.
- Sabio JM, Vargas-Hitos J, Zamora-Pasadas M, Mediavilla JD, Navarrete N, Ramirez A, Hidalgo-Tenorio C, Jáimez L, Martín J, Jiménez-Alonso J; Grupo Lupus Virgen de las Nieves. Metabolic syndrome is associated with increased arterial stiffness and biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36: 2204- 11.
- Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Pafrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ and Wilson PW. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108: 2154-69.
- Sella E, Sato E, Barbieri A. Coronary artery angiography in systemic lupus erythematosus patients with abnormal myocardial perfusion scintigraphy. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48: 3168-75.
- Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald S, Tracy R, Kuller L, Manzi S. Vascular stiffness in women with systemic lupus erythematosus. *Hypertension* 2001; 37:1075-82.
- Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Pratt JE, Tracy RP, Kuller LH, Manzi S. Comparison of risk factors for vascular disease in the carotid artery and aorta in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50: 151-9.

- Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, Mariat C, Froissart M, Cristol JP. Cystatin C: current position and future prospects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2008; 46:1664-86.
- Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Freid LF, Stephen LS, Newman AB, Siscowick MD, Stehman Breen MD. Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 2049-60.
- Silva MV, Moscoso Solorzano G, Nishida SK, Kirsztajn GM. Are serum cystatin C levels influenced by steroid doses in lupus nephritis patients? *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2011; 33: 306-12.
- Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1985; 45: 97-101.
- Singh D, Whooley MA, Ix JH, Ali S, Shlipak MG. Association of cystatin C estimated GFR with inflammatory biomarkers: the Heart and Soul Study. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2007; 22: 1087-92.
- Shang Q, Tam LS, Li EK, Yip GW, Yu CM. Increased arterial stiffness correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008; 17: 1096-1102.
- Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49: 741-52.
- Stevens LA, Schmid CH, Greene T, Li L, Beck GJ, Joffe MM, Froissart M, Kusek JW, Zhang YL, Coresh J, Levey AS. Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney International* 2009; 5: 652-60.
- Taglieri N, Koenig W, Kaski JC. Cystatin C and cardiovascular risk. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 1932-43.
- Tang GD, Lewis AV, James TJ, Altmann P, Taylor RP, Levy JC. Clinical usefulness of cystatin C for the estimation of glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 2004-9.
- Theodoridou A, Bento L, D'Cruz D, Khamashta M, Hughes G. Prevalence and associations of an abnormal ankle-brachial index in systemic lupus erythematosus: a pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003; 62: 1199-1203.
- Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Kao A, Fitzgerald SG, Shook B, Tracy RP, Kuller LH, Brockwell S, Manzi S. Progression of carotid intima-media thickness and plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2008; 58: 835-42.
- Tso TK, Huang WN, Huang HY, Chang CK. Association of brachial-ankle pulse wave velocity with cardiovascular risk factors in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005; 14: 878-83.

- Tso TK, Huang HY, Chang CK, Huang WN. A positive correlation between homocysteine and brachial-ankle pulse wave velocity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology* 2006; 25: 285-90.
- Tziomalos K, Sivanadarajah N, Mikhailidis DP, Boumpas DT, Seifalian AM. Increased risk of vascular events in systemic lupus erythematosus: is arterial stiffness a predictor of vascular risk? *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008; 26: 1134-45.
- Urbonaviciene G, Shi GP, Urbonavicius S, Henneberg EW, Lindholt JS. Higher cystatin C level predicts long-term mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2011; 216: 440-5.
- Urowitz M, Bookman A, Koehler B, Gordon D. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Medicine* 1976; 60: 221-5.
- Urowitz M, Gladman D, Ibañez D, Fortin P, Sánchez-Guerrero J, Bae S, Clarke A, Bernatsky S, Gordon C, Hanly J, Wallace D, Isenberg D, Ginzler E, Merrill J, Alarcon G, Steinsson K, Petri M, Dooley MA, Bruce I, Manzi S, Khamashta M, Ramsey-Goldman R, Zoma A, Sturfelt G, Nived O, Maddison P, Font J, van Vollenhoven R, Aranow C, Kalunian K, Stoll T, Buyon J. Clinical manifestations and coronary artery disease risk factors at diagnosis of systemic lupus erythematosus: data from an international inception cohort. *Lupus* 2007a; 16: 731-5.
- Urowitz M, Ibañez D, Gladman D. Atherosclerotic vascular events in a single large lupus cohort: prevalence and risk factors. *The Journal of Rheumatology* 2007b; 34: 70-5.
- Valdivielso P, Gómez-Doblas J.J, Macias M, Haro-Liger M, Fernández-Nebro A, Sánchez-Chaparro MA, González-Santos P. Lupus-associated endothelial dysfunction, disease activity and arteriosclerosis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008; 26: 827-33.
- Valero- Gonzalez S, Castejon R, Jimenez-Ortiz c, Rosado S, Tutor –Ureta P, Vargas J-A, Yebra-Bango M. Increased arterial stiffness is independently associated with metabolic síndrome and damage index in systemic lupus erythematosus patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2014; 43: 54-8.
- Viollet L, Gailey S, Thornton DJ, Friedman NR, Flanigan KM, Mahan JD, Mendell JR. Utility of cystatin C to monitor renal function in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2009; 40: 438-42.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *Journal of American College of Cardiology* 2010; 55: 1318-27.
- Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Moriatas M, Naidoo D, Wilcken DE. Relations between markers of renal function, coronary risk factors and the occurrence and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008; 197: 853-9.

- Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42: 338-46.
- Wasén E, Isoaho R, Mattila K, Vahlberg T, Kivelä SL, Irjala K. Serum cystatin C in the aged: relationships with health status. *American Journal of Kidney Diseases* 2003;42: 36-43.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353: 999–1007.
- Westerweel PE, Luijten RK, Hoefer IE, Koomans HA, Derksen RH, Verhaar MC. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007; 66: 865-70.
- White CA, Akbari A, Doucette S, Fergusson D, Ramsay T, Hussain N, Dinh L, Filler G, Lepage N, Knoll GA. Effect of clinical variables and immunosuppression on serum cystatin C and beta-trace protein in kidney transplant recipients. *American Journal of Kidney Diseases* 2009;54: 922-30.
- Wiesli P, Schwegler B, Spinass GA, Schmid C. Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clinica Chimica Acta* 2003; 338: 87–90.
- Woitas RP, Stoffel-Wagner B, Flommersfeld S, Poege U, Schiedermaier P, Klehr HU, et al. Correlation of serum concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in liver cirrhosis. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 712-5.
- Wu CK, Lin JW, Caffrey JL, Chang MH, Hwang JJ, Lin YS. Cystatin C and long-term mortality among subjects with normal creatinine-based estimated glomerular filtration rates: NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey). *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 56: 1930-6.
- Yamashita H, Nishino T, Obata Y, Nakazato M, Inoue K, Furusu A, Takamura N, Maeda T, Ozono Y, Kohno S. Association between cystatin C and arteriosclerosis in the absence of chronic kidney disease. *Journal of the Atherosclerosis and Thrombosis* 2013; 20: 548-56.
- Yiu KH, Wang S, Mok MY, Ooi GC, Khong PL, Mak KF, Lam KF, Lau CS, Tse HF. Pattern of arterial calcification in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2009; 36: 2212-27.
- Zardi EM, Afeltra A. Endothelial dysfunction and vascular stiffness in systemic lupus erythematosus: are they early markers of subclinical atherosclerosis? *Autoimmunity Reviews* 2010; 9: 684-6.